

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE



DIPARTIMENTO DI MEDICINA E DI SCIENZE DELLA SALUTE

DOTTORATO IN SCIENZE PER LA SALUTE

XXV CICLO

TESI SPERIMENTALE

IN

FARMACOLOGIA

**“TAU NUCLEARE:
UN POSSIBILE NUOVO TARGET PER LA
TERAPIA DELLA MALATTIA DI
ALZHEIMER”**

COORDINATORE

Ch.mo Prof. Guido Maria Grasso

TUTOR

Ch.mo Prof. Claudio Russo

DOTTORANDA

Daniela Passarella

Matr. 141506

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

Indice

Abstract	pag. 5
Capitolo 1: Introduzione	pag. 8
1.1 - Cenni storici	pag. 9
1.2 - Presentazione clinica	pag. 9
1.3 - Neuropatologici	pag. 10
1.4 - AD: geni e fattori di rischi	pag. 15
1.5 - Proteine coinvolte nell'eziologia dell'AD	
1.5.1 - Proteina Precursore dell'Amiloide (A β PP)	pag. 16
1.5.2 - Preseniline 1 e 2 (PS1 e PS2)	pag. 20
1.5.3 - Tau	pag. 25
1.6 - Eziopatogenesi: ipotesi a confronto	
1.6.1 - Ipotesi dell'Amiloide	pag. 31
1.6.2 - Ipotesi del ciclo cellulare	pag. 32
1.7 - Razionale della ricerca	pag. 34
Capitolo 2: Materiali e metodi	
2.1 - Colture cellulari	pag. 36
2.2 - Anticorpi	pag. 37

2.3 - Farmaci e droghe	pag. 38
2.4 - Costrutti	pag. 39
2.5 - Trasfezione di DNA	pag. 40
2.6 - Immunofluorescenza	pag. 40
2.7 - Saggio MTT	pag. 41
2.8 - Saggio BrdU	pag. 42
2.9 - Western blot	
2.9.1 - Estrazione delle proteine	pag. 43
2.9.2 - Conta della concentrazione proteica	pag. 44
2.9.3 - Preparazione dei campioni	pag. 44
2.9.4 - Elettroforesi e trasferimento	pag. 44
2.10 - Animali e trattamento	pag. 46
2.11 - Immunoistochimica	
2.11.1 - Immunoistochimica su fettine di cervello “free floating”	pag. 46
2.11.2 - Immunoistochimica su fettine di cervello incluse in paraffina	pag. 47

Capitolo 3: Risultati

3.1 - Localizzazione intracellulare di fosfo-tau in fibroblasti embrionali di topo e sua regolazione mediata da A β PP	pag. 49
3.2 - Localizzazione intracellulare di fosfo-tau in un modello cellulare di trisomia 21	pag. 52
3.3 - Localizzazione di fosfo-tau in tessuti autoptici cerebrali controllo e AD	pag. 52
3.4 - Modulazione di fosfo-tau in funzione del processing di A β PP	pag. 56
3.5 - Meccanismo molecolare di accensione/spegnimento di fosfo-tau nei compartimenti citoplasma/citoscheletro e nucleare	
3.5.1 - Compartimentalizzazione di tau	pag.57
3.5.2 - Attivazione di chinasi in dipendenza di A β PP	pag. 59
3.5.3 - Cinetica rapida di attivazione di ERK1,2 e di fosfo-tau	pag. 62
3.6 - A β PP e tau come modulatori del ciclo cellulare	pag. 64
3.7 - Tau extranucleare e mitosi	pag. 66

3.8 - Overespressione di A β PP e morte cellulare in neuroni	pag. 69
3.9 - Selenato di sodio per la riduzione della fosforilazione ed aggregazione di tau in un modello di tauopatia umana	
3.9.1 - Selenato di sodio e riduzione della fosforilazione di tau	pag. 71
3.9.2 - Selenato di sodio come attivatore della fosfatasi	pag. 76
3.9.3 - Selenato di sodio e attivazione indiretta dell'autofagia	pag. 77

Capitolo 4: DISCUSSIONE	pag. 80
--------------------------------	---------

Riferimenti bibliografici	pag. 91
----------------------------------	---------

Pubblicazioni e partecipazioni a congressi	pag. 113
---	----------

Ringraziamenti	pag. 114
-----------------------	----------

ABSTRACT

Tau is a microtubule-stabilizing protein detected in both cytosolic/cytoskeletal and nuclear cellular compartments of neuronal and non-neuronal cells, with a tightly regulated phosphorylation, in physiology (mitosis for example) and pathology (neurofibrillary tangles). In Alzheimer's disease (AD) it is not yet established whether entangled tau represents a cause or a consequence of neurodegeneration. The amyloid β -precursor protein (A β PP) is considered pivotal in the genesis of AD, and the "amyloid hypothesis" states that amyloid β -peptides (A β), derived from aberrant A β PP processing, cause neurodegeneration and tau hyperphosphorylation.

Here we provide evidence that A β PP, when ectopically overexpressed or in cells bearing trisomy 21, modulates the phosphorylation of tau in mitotic and pathogenic phosphoepitopes during cell cycle and regulates the intracellular localization of phospho-tau, reducing the nuclear pool and the overall ratio nuclear/cytoskeletal. We show that the modulation of tau phosphorylation mediated by A β PP is strictly dependent on γ -secretase activity as well. This specific phosphorylation of tau is required during mitosis *in vitro* and *in vivo*, likely via an ERK1/2 signaling cascade; the consequent phenotype is an upregulation of cell growth kinetic induced by A β PP in proliferating cell lines. Also in differentiated neuronal A1 cells, the overexpression of A β PP modulates tau phosphorylation, altering the ratio between cytoskeletal and nuclear pools, but in this case A β PP induces cell death. The nuclear localization of phospho-tau is significantly underrepresented in neurons of AD patients, in which predominate neurofibrillary tangles, in comparison to non-AD patients. Finally we investigate the potential protective effect of sodium selenate on tau phosphorylation and tau inclusions in a transgenic mouse model of human tauopathy. Treatment with sodium selenate in these transgenic mice reduces both phospho-tau and tau inclusions, likely by activating phosphatase activity (PP2A) and increasing the autophagic degradation of tau aggregates. In summary, in this work we provide evidence for a direct contribution of A β PP in a signaling activity targeted to the activation of specific kinases, with a role in the phosphorylation and homeostasis of the nuclear and the cytoskeletal pool of tau, with consequences in cell cycle dynamics that may lead to cell death in postmitotic neurons. The use of pharmacological tools that may reduce kinases' activation and stimulate the autophagic degradation of tau inclusions, as

shown here using Na Selenate in transgenic mice, may revert this pathological process. In our opinion a deeper comprehension of molecular mechanisms that cause the disequilibrium between nuclear vs cytoskeletal phosphorylation of tau is essential for the identification of novel targets for AD therapy.

“Ci sono poche cose più spaventose del pensiero di perdere la ragione e di perdere le ultime briciole di consapevolezza che ti legano alla tua vita e alle persone che ti circondano. Per i malati di Alzheimer “fortunati” queste parole restano tali, una paura intrinseca che li accompagna nel decorso della loro malattia; per altri, probabilmente la maggior parte di loro, questa paura diventa realtà, una realtà che a poco a poco logora la loro ragione portandogliela impotentemente via”

Capitolo 1

INTRODUZIONE

La malattia di Alzheimer (AD) rappresenta il 50-60% di casi di demenza mondiale. Demenza è un termine usato per descrivere diverse malattie cerebrali che comportano l'alterazione progressiva di alcune funzioni (memoria, pensiero, ragionamento, linguaggio, orientamento, personalità e comportamento) di severità tale da interferire con gli atti quotidiani della vita. La demenza non ha confini sociali, economici, etnici o geografici. Attualmente sono stimati 35,6 milioni di casi al mondo affetti da demenza e le stime annunciano cifre allarmanti: si prevede infatti un raddoppio di tale numero nei prossimi 20 anni, con 65,7 milioni di malati nel 2030 e 115,4 milioni nel 2050. La stima delle persone affette da demenza in Italia è di circa un milione, e di queste circa 600 mila soffrono della malattia di Alzheimer.

L'AD è un disordine neurodegenerativo eterogeneo con progressione irreversibile che interessa primariamente le regioni ippocampali e neocorticali del cervello. È caratterizzata dalla perdita delle funzioni psico-mentali superiori, con conseguente affievolimento dell'attenzione, della concentrazione, della memoria e delle capacità cognitive e di pensiero: vengono colpite le funzioni di pensare, di sentire e di agire. Il malato di Alzheimer soffre un drastico cambiamento della personalità, con tendenza a deprimersi o ad irritarsi, in reazione alle progressive perdite dei suoi processi mnesici e cognitivi. Non riesce più a seguire le istruzioni, soffre di confusioni e momenti di disorientamento; può presentare alterazioni del giudizio, confondere le sembianze dei suoi familiari, non ricordare più i loro nomi o quelli delle persone per lui abituali e, persino, non riconoscere nemmeno se stesso. L'incidenza della malattia di Alzheimer aumenta con l'età e, con l'allungamento della vita umana media, questa malattia sta diventando uno dei maggiori problemi sanitari legato all'invecchiamento della popolazione mondiale. Non esiste al momento alcuna cura efficace contro di essa e la patogenesi della malattia resta ancora oggetto di molte teorie che coinvolgono fattori genetici ed epigenetici (come fattori metabolici o ambientali).

1.1 Cenni Storici

La malattia di Alzheimer fu descritta per la prima volta nel 1907 dal neuropatologo Alois Alzheimer (1864-1915) che ne descrisse la neuropatologia analizzando il tessuto cerebrale di una paziente deceduta in seguito ad una malattia mentale con fenotipo severo, caratterizzata da gravi disturbi della memoria e demenza, nonostante fosse un soggetto in età pre-senile (Alzheimer A., 1907). I segni neuropatologici tipici della AD per la prima volta descritti da Alzheimer ed in seguito caratterizzati sono: a) lesioni extracellulari in forma di placche composte da materiale proteinaceo amiloideo situate nel parenchima cerebrale, b) aggregati proteici intracellulari in neuroni distrofici (*neurofibrillary tangles*, NFT; Iqbal et al., 2008), c) perdita neuronale e d) infiammazione reattiva e gliosi (Serrano-Ponzo et al., 2011).

Ad oggi la causa della AD non è stata ancora chiarita e benché siano noti alcuni geni chiaramente correlati con la genesi di forme familiari di AD, ci troviamo ancora nello stesso imbarazzo in cui si trovò un secolo fa Alois Alzheimer nel cercare di capire l'origine della malattia.

1.2 Presentazione Clinica

La malattia di Alzheimer è una malattia neurodegenerativa con inizio insidioso e progressione inesorabile, caratterizzata dal declino delle capacità cognitive e della memoria.

La fase iniziale di questa demenza è spesso subdola, sottovalutata e diagnosticata non correttamente come una normale componente del processo di invecchiamento fisiologico. È molto difficile identificare l'esatto momento dell'inizio della malattia, poiché questo è graduale. Generalmente il primo sintomo è un lieve deficit di memoria, che progredisce gradualmente. Nelle fasi iniziali negli individui anziani la perdita della memoria tende ad essere più marcata per gli eventi recenti; con l'avanzare della malattia anche la memoria remota viene invariabilmente persa ed il paziente è incapace persino di riconoscere i propri familiari. Si manifestano inoltre alterazioni delle altre funzioni superiori: il pensiero astratto risulta impoverito, con ridotta capacità di ragionamento logico e concettualizzazione, la capacità di giudizio è diminuita, cosicché il paziente manifesta un ridotto rendimento lavorativo e può essere incapace di affrontare e risolvere problemi

anche semplici relativi ai suoi rapporti interpersonali o familiari. Si manifestano labilità emotiva e mutamento della personalità. Spesso compare apatia e si accentuano i caratteri premorbose della personalità, quali atteggiamenti ossessivi o compulsivi, aggressività e paranoia. A volte vi è invece un mutamento della personalità, per cui soggetti solitamente controllati e misurati diventano impulsivi, intrattabili ed a volte anche violenti. Altri possibili sintomi comuni della malattia di Alzheimer sono: afasia isolata o con difficoltà visuo-spaziali (compromissione delle capacità di linguaggio), aprassia (incapacità ad eseguire attività motorie nonostante l'integrità della comprensione e della motricità) e agnosia (incapacità a riconoscere o identificare oggetti in assenza di deficit sensoriali).

In una fase intermedia della malattia si osserva una compromissione ulteriore del comportamento ed un completo disorientamento spazio- temporale. La memoria remota è compromessa (Monastero et al. 2009).

Nelle fasi avanzate dell'AD, il paziente è incapace di svolgere qualsiasi attività della vita quotidiana, compare generalmente incontinenza. La memoria a breve e lungo termine è totalmente persa ed il paziente può divenire mutacico ed acinetico. Si manifesta disfagia ed il rischio di complicanze, quali malnutrizione, disidratazione, malattie infettive (polmoniti soprattutto), fratture e piaghe da decubito diviene elevato (van der Linde, 2012, Mariani et al., 2007).

Nell'AD vi sono comuni manifestazioni che ricordano comportamenti tipici dei disordini psicotici funzionali, quali depressione, sintomi psicotici e disturbi del sonno. La sopravvivenza media è di 4.2 anni per gli uomini e 5.7 anni per le donne; in alcuni casi può arrivare a 10 anni ma ad ogni modo è molto variabile. Fattori come l'età di insorgenza della malattia, la severità, la debilitazione generale, segni extrapiramidali, il sesso e la provenienza etnica e la scolarità incidono sulla variabilità della durata della vita di un paziente affetto da AD (Larson et al., 2004, Walsh et al. 1990, Rountree et al., 2012; Cereda et al., 2013).

1.3 Neuropatologia

La neuropatologia dell'AD è stata descritta estensivamente e negli ultimi anni ha conosciuto un approfondimento delle conoscenze biochimiche e genetiche legate alla formazione delle lesioni cerebrali (Schellenberg et al., 2012). Il quadro anatomopatologico macroscopico della malattia di Alzheimer è caratterizzato da una notevole atrofia del

cervello, con circonvoluzioni cerebrali ristrette, solchi e ventricoli ampliati; il peso del cervello soprattutto nelle fasi avanzate della malattia, può essere ridotto anche del 20%. L'atrofia coinvolge i lobi frontali, temporali e parietali, e in modo marcato l'ippocampo, la cui atrofia è talmente caratteristica da essere ritenuta, da alcuni autori, come diagnostica. Microscopicamente si può osservare una cospicua perdita cellulare soprattutto a livello corticale; particolarmente colpiti risultano l'ippocampo, la corteccia entorinale, il giro paraippocampale e il subiculum. Sono depauperati anche il nucleo anteriore del talamo, i nuclei settali e la banda diagonale di Broca, l'amigdala e le porzioni del tronco cerebrale appartenenti ai sistemi monoaminergici. Anche i neuroni colinergici del nucleo basale di Meynert e del locus coeruleus sono numericamente ridotti. La perdita neuronale interessa sia le grosse cellule piramidali sia gli interneuroni. Molti dei neuroni superstiti sono di volume ridotto e con minore numero di dendriti, i quali, a loro volta, si presentano addossati l'uno all'altro, a causa della perdita di sinapsi e neuropilo; la perdita sinaptica che accompagna la degenerazione neuronale è correlata ai deficit mnesici dell'AD (Terry et al., 1991). Alle alterazioni neuronali si associa una proliferazione astrocitaria, soprattutto negli strati III e IV della corteccia. Sebbene l'atrofia cerebrale sia un reperto relativamente costante nell'AD, la considerevole variabilità che si può osservare tra i diversi casi ne impedisce l'utilizzo come marcatore diagnostico affidabile (Thompson et al., 2012).

A livello microscopico la neuropatologia è caratterizzata da:

- **perdita neuronale:** studi fatti sulla corteccia frontale, rostro-temporale e sulla regione parietale inferiore di soggetti di età compresa tra i 70 ed i 90 anni rivelano una diminuzione dei neuroni della neocorteccia del 30% rispetto a controlli sani. Gli stessi studi, fatti su soggetti colpiti dall'AD tra i 50 ed i 69 anni, hanno rivelato, invece, una diminuzione del 60%. Ne deriva quindi che i pazienti più giovani mostrano una perdita neuronale maggiore rispetto ai pazienti più anziani. Oltre a queste, altre aree presentano morte neuronale: l'ippocampo (area CA1 e CA3), il secondo strato della corteccia entorinale, il nucleo basale di Meynert, il locus coeruleus ed il nucleo dorsale del raphe (Zilkova et al., 2006, Padurariu et al., 2012).

- **placche neuritiche:** sono costituite da depositi extracellulari di amiloide associati a danno assonale e dendritico, generalmente rappresentati in grande numero a livello della corteccia temporale, parietale, frontale e soprattutto entorinale ed all'ippocampo, mentre la

corteccia occipitale ed il cervelletto sono quasi sempre risparmiati da tale fenomeno (Dickson, 1997; Skaper et al., 2012; Glenner and Wong, 1984); queste formazioni contengono depositi insolubili del peptide A β , un peptide congofilico e fibrillogenico, principalmente in forma filamentosa, che nella parte centrale della placca si addensano a formare un “core” compatto, e neuriti distrofici, i quali si localizzano sia dentro, sia in prossimità dei depositi amiloidei. Normalmente nei soggetti con AD la concentrazione di placche a livello ippocampale è di gran lunga superiore al numero di placche che talvolta si può riscontrare in soggetti anziani non dementi o in altre malattie neurologiche. Tuttavia è talvolta possibile riscontrare un alto numero di placche anche in soggetti molto anziani ma senza demenza (Fuld et al., 1988).

Le placche hanno una struttura approssimativamente sferica ed hanno dimensioni molto variabili che possono andare da 10 a parecchie centinaia di micrometri. La sostanza amiloide è formata da fibrille con conformazione a β -foglietto di 6-10nm di diametro presenti nello spazio extracellulare, costituite da una proteina, chiamata A β 1-42 che deriva da un precursore di maggiori dimensioni (Amyloid β -Protein Precursor: A β PP). I neuriti danneggiati si presentano dilatati, con alterazioni ultrastrutturali, tra cui lisosomi rigonfi, aumentato numero di mitocondri e filamenti elicoidali accoppiati, generalmente indistinguibili da quelli che compongono gli ammassi neurofibrillari. La placca senile è inoltre associata ad elementi microgliali ed astrocitari attivati.

Sono stati identificati due tipi principali di placche: quelle “mature” e quelle “diffuse”. Le placche mature hanno le caratteristiche di colorazione tipiche di tutte le amiloidosi: sono infatti positive sia alla colorazione con Congo-Rosso, con caratteristica birifrangenza rosso-verde in luce polarizzata, sia alla tioflavina S ed hanno un’organizzazione concentrica con un’alta densità di materiale proteinaceo aggregato al centro e più diffuso all’esterno (Braak and Braak, 1997; Maezawa et al., 2008; Rostagno et al., 2009; Pinney et al., 2012). Le placche mature contengono nella zona periferica anche neuriti distrofici ed astrociti reattivi. Le placche del secondo tipo o diffuse, talvolta negative al Congo-Rosso, sono associate ad alterazioni minime parenchimali. Queste placche sono anche definite pre-amiloidi poiché agli esordi della malattia si riscontrano soprattutto questo tipo di lesioni e perché sono stati identificati soggetti asintomatici che presentavano questo tipo di placche.

- **agglomerati neurofibrillari (*tangles*):** sono ammassi intracellulari consistenti di filamenti elicoidali appaiati (PHF) di 10nm di spessore. Il maggior componente di questi filamenti è la forma iperfosforilata della proteina tau, una proteina che lega i microtubuli. Quando tau è iperfosforilata, diminuisce la sua capacità di legare i microtubuli e aggrega quindi in maniera anomala determinando la formazione dei PHF. L'aggregazione di tau in filamenti porta al collasso dei microtubuli ed ad una riduzione del trasporto assonale, fondamentale nel trasferimento di sostanze di natura trofica ed energetica tra corpo cellulare e sinapsi. L'efficienza di questo trasporto è necessaria per mantenere buone connessioni neuronali; quando il trasporto viene alterato i neuroni degenerano e la rete neuronale coinvolta nelle varie funzioni cognitive e vitali viene interrotta, provocando i sintomi tipici della malattia di Alzheimer (Goedert et al., 1992). Gli aggregati neurofibrillari, localizzati soprattutto nel citoplasma dei neuroni più grandi e solo raramente nei neuroni di dimensione piccola o media (Goedert et al., 1988; Binder et al., 2005), rappresentano lesioni che accomunano diverse malattie neurodegenerative. Oltre ad essere caratteristici dell'AD, sono stati infatti ritrovati nella sostanza nigra in casi di Parkinson, nella neocorteccia in casi di demenza pugilistica, nel normale processo di invecchiamento ed in una serie di malattie neurodegenerative chiamate "Tauopatie" comprendenti: Progressive Supranuclear Palsy (PSP), Corticobasal Degeneration (CBD), Pick's Disease, argyrophilic grain disease e dalla Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) (Morris et al., 2001; Spillantini et al., 2000 a/b). La recente identificazione di mutazioni sul gene codificante tau sia in alcune famiglie affette da FTDP-17 sia in famiglie di PSP e Pick's Disease, ha chiaramente stabilito che i disordini e i danni al citoscheletro, indotti dalle mutazioni sulla tau, sono di per sé sufficienti ad indurre neurodegenerazione e demenza anche in assenza di amiloidosi e placche (Spillantini et al., 1998; Goedert et al., 2000; Delacourte et al., 2000; Neumann et al., 2001; Lee et al., 2001; Tanaka et al., 2012; Goedert et al., 2012).

- **amiloidosi dei vasi o angiopatia amiloide:** si osservano dei depositi di A β (lo stesso peptide presente nelle placche) più o meno accentuati anche a carico dei vasi meningei. È una caratteristica costante nell'AD con esordio tardivo, ma non peculiare di questa patologia, in quanto si osserva anche nei casi di emorragia cerebrale, nelle amiloidosi vascolari da transtiretina o cistatina e nella demenza di tipo vascolare (Glenner and Wong, 1984; Olafsson et al., 1996; Love, 2004).

- **alterazione sinaptica:** le principali funzioni cognitive dipendono in larga misura sia dalle interconnessioni tra i neuroni sia dall'attività plastica della neocorteccia e quindi dall'integrità strutturale del sistema sinaptico. Si è riscontrata una perdita di sinapsi molto accentuata nelle vicinanze delle placche neuritiche mature (Dekosky and Scheff, 1990) dove si possono trovare sinapsi anomale raccolte a grappoli intorno ai filamenti dendritici degenerati. La gravità dei danni alle sinapsi non segue un gradiente intorno alle placche neuritiche: questo ha portato ad ipotizzare che il processo patogenetico della AD cominci con la perdita di sinapsi e con la neurodegenerazione piuttosto che con la deposizione di β -amiloide. E' molto importante notare che la perdita di sinapsi nella corteccia è maggiore della diminuzione dei corpi neuronali, quindi le terminazioni scompaiono prima del soma (Shankar et al., 2009).

- **infiammazione con attivazione gliale:** negli anni recenti si è sviluppato un interesse crescente per tutta una serie di evidenze neuropatologiche che indicano la presenza di un importante effetto infiammatorio e di risposta immunitaria nel parenchima cerebrale dei pazienti affetti da AD (Cameron e Landreth, 2010; Lautner et al., 2011). Tipici marcatori di infiammazione e di risposta immunitaria quali α 1-antichimotripsina, α 2-macroglobulina, attivazione della microglia con produzione di IL1 e IL6, $\text{TNF}\alpha$ assieme a componenti del MAC quali C5b-9 sono tutti altamente espressi, suggerendo che proteine della fase acuta, citochine, attivazione del complemento e cellule microgliali attivate potrebbero partecipare al processo neurodegenerativo (Eikelenboom et al., 2002). La presenza di una reazione infiammatoria cronica è particolarmente evidente nell'AD (anche se non esclusiva di tale patologia, ma comune ad altre patologie che presentino anche amiloidosi, quali ad esempio alcune forme di malattie da prioni), ed è stato ipotizzato che l'infiammazione possa contribuire in maniera significativa alla morte neuronale. Inoltre, è noto da studi epidemiologici che i farmaci antinfiammatori potrebbero svolgere un ruolo protettivo in pazienti AD ritardando l'esordio e rallentando la progressione della malattia (Selkoe, 2001). La reazione immune presente nella AD è tipicamente locale; non coinvolge infatti né cellule T, né cellule B ed il repertorio di elementi veicolati dal plasma è minimo o assente. Nella risposta immuno-infiammatoria del telencefalo, i protagonisti sono le cellule gliali (microglia ed astrociti) che, con i neuroni, sono in grado di produrre in loco proteine della fase acuta, citochine, fattori di crescita, proteine del complemento e loro

inibitori, trombina e proteine della coagulazione, proteoglicani (Eikelenboom et al., 2002; Sastre et al., 2006).

1.4 AD: geni e fattori di rischio

L'AD è classificata in base al suo momento di insorgenza: se questa avviene prima dei 65 anni di età si parla di "presenile" o "*early-onset*" (EOAD) mentre se l'insorgenza è successiva ai 65 anni si parla di demenza "senile" o "*late-onset*" (LOAD) (circa il 90% dei casi). Diversi studi generalizzano le demenze presenili come familiari e su base autosomica dominante mentre quelle senili ad incidenza sporadica; anche in queste però sembra esserci una percentuale rilevante a carattere ereditario autosomico dominante (Muller et al., 2012).

La patogenesi è complessa e dipende sia da fattori genetici che ambientali (Povova et al., 2012). Sebbene la maggior parte dei casi sporadici della malattia abbia un'etiologia ignota, le forme familiari (FAD) di AD possono essere chiaramente e direttamente collegate a 3 loci genetici, le cui mutazioni inducono la malattia: il locus della proteina precursore del peptide β -amiloide, A β PP, ed i loci di due geni che codificano per le preseniline, PS1 e PS2, che fanno parte del complesso enzimatico che porta alla generazione del peptide amiloide. Tutte le mutazioni a carico di A β PP finora conosciute portano ad un aumento nella produzione del peptide β -amiloide, in particolare della sua isoforma più lunga, quella costituita da 42 aminoacidi (A β 42) e che, rispetto alla variante di 40 residui, è più neurotossica per la sua maggiore tendenza ad aggregare (Gandy and Petanceska, 2000). È stato dimostrato che anche le mutazioni a carico delle preseniline portano ad un aumento della produzione di A β 42 (Scheuner et al., 1996). I casi di malattia di Alzheimer sporadici sono associati a polimorfismi genici che si comportano come fattori di rischio: tra questi un ruolo chiave è svolto dal locus del gene dell'Apolipoproteina E, ed in particolare dall'allele ϵ -4 (Ertekin-Taner et al., 2010). L'Apolipoproteina E è una molecola coinvolta nel trasporto del colesterolo, di cui si conoscono tre isoforme, codificate dagli alleli ϵ -2, ϵ -3, ϵ -4. È stato dimostrato che chi eredita una copia dell'allele ϵ -4 ApoE4 ha una predisposizione a sviluppare la forma ad insorgenza tardiva dell'AD di 4 volte mentre chi ne eredita due copie il rischio è di 10 volte; inoltre, l'età dell'insorgenza della malattia è anticipata rispetto ai soggetti che presentano gli altri alleli. C'è, poi, una lunga lista di geni rappresentanti possibili fattori di rischio, il cui ruolo va confermato su casistiche più vaste (Tanzi, 2012). Tra questi vi sono: ATXN1 (atassina 1),

CD33 (siglec 3), ed un locus non caratterizzato sul cromosoma 14 (GWA_14q31.2). Sembra che la variante allelica dell'atassina 1 (ATXN1), una proteina multi-dominio caratterizzata da code di poliglutammine (poli-Q), influisca sui livelli di A β modulando l'attività β -secretasica (Zhang et al. 2010). CD33, invece, è una glicoproteina transmembrana di tipo I da 67 kDa appartenente alla famiglia Siglec (lectina della superfamiglia di immunoglobuline leganti l'acido sialico), coinvolta nelle interazioni cellula-cellula che regolano il sistema innato immunitario e il processo infiammatorio. Nel 2009 altri tre nuovi geni sono stati aggiunti alla lista dei possibili fattori di rischio per l'AD; tra questi il gene CLU (clusterina, apolipoproteina J), CR1 (recettore del complemento di tipo 1) e PICALM (proteina associata alla clatrina) (Harold et al., 2009). Attualmente è noto che CLU interagisce con i peptidi A β nelle placche amiloidee e si ritiene che CLU, insieme con CR1, possa avere un ruolo nella *clearance* del materiale A β . Per quanto riguarda PICALM, è stato accertato che è implicata nell'endocitosi mediata da clatrina e nella direzione del traffico di VAMP2 (proteina vescicolare del complesso SNARE) (Zhang et al. 2010; Gu et al., 2011).

A queste varianti alleliche, nel 2011 se ne sono aggiunte ancora altre: CD2AP, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, and ABCA7 (Seshadri et al. 2010, Hollingworth et al. 2011; Tanzi, 2012). Accanto ai 15 geni associati alla patogenesi dell'AD, sono state poi identificate anche varianti alleliche protettive della malattia tra cui quella ϵ -2 ApoE2 ed una codificante per la proteina adattatrice Fe65 (Corder et al., 1994; Hu et al., 2002).

1.5 Proteine coinvolte nell'eziologia dell'AD

1.5.1 Proteina Precursore dell'Amiloide (A β PP)

La purificazione ed il sequenziamento di A β dalle placche amiloidi presenti in casi di AD e di sindrome di Down e l'osservazione che A β derivasse dalla maturazione proteolitica di una proteina molto più grande detta A β PP, precursore del peptide β amiloide, hanno portato all'identificazione ed al clonaggio del gene di A β PP (Glenner and Wong, 1984).

Il gene di A β PP è localizzato sul cromosoma 21 (Korenberg et al., 1989) e ciò da

ragione del fatto che nella sindrome di Down, caratterizzata dalla trisomia di questo cromosoma, l'eccessivo dosaggio genico porta all'aumentata espressione della proteina A β PP, che da solo è capace di indurre l'accumulo di A β e la comparsa, dopo i 40 anni, dei segni anatomico-patologici della malattia di Alzheimer (Boeras et al., 2008).

La famiglia dei geni di A β PP di mammifero è composta da 3 membri: A β PP le proteine A β PP-like, APLP1 e APLP2. Sono stati identificati geni omologhi in *Drosophila* e *C.elegans* (Rosen et al., 1989; Daigle et al., 1993). Tutti i membri della famiglia di A β PP sono proteine integrali di membrana di tipo I con un grosso dominio extracellulare N-terminale ed un corto dominio citosolico C-terminale. Le proteine di mammifero sono ubiquitariamente espresse. Il gene di A β PP contiene 19 esoni, e tra questi l'esone 7, 8 e 15 possono subire splicing alternativo, dando vita a tre diverse isoforme: A β PP695, A β PP751, A β PP770. L'isoforma più corta (A β PP695) è espressa esclusivamente nei neuroni, mentre le altre sono ubiquitarie e contengono un dominio di inibizione delle proteasi tipo Kunitz.

Il dominio extracellulare di A β PP e delle proteine APLPs è sede di modificazioni post-trasduzionali che ne aumentano notevolmente la complessità e che avvengono durante la sua maturazione nell'ER e nel Golgi. Esso presenta, infatti, siti di O- ed N- glicosilazione, di sulfatazione, di fosforilazione, di legame di metalli (Cu⁺⁺) e di legame dell'eparina; inoltre lo splicing dell'esone 15 determina la formazione di un sito di legame per il condroitin-solfato-glicosaminoglicano (CS- GAG) che viene utilizzato negli astrociti ma non nei neuroni (Annaert et al., 2002).

Processing. L'A β PP può essere metabolizzata nella cellula secondo due diversi processi: la via α , non amiloidogenica, in quanto il sito di taglio dell' α -secretasi è proprio all'interno del dominio dell'A β e la via β , amiloidogenica, che invece porta alla produzione di A β . Oltre al taglio da parte delle secretasi, A β PP può essere anche substrato di caspasi (De Strooper et al., 2000; Zhang et al., 2011).

La via non amiloidogenica, prevede un primo taglio mediato dall' α -secretasi, identificata nella metalloproteasi ADAM-10 (Marcinkiewicz and Seidah, 2000) tra la Lys16 e la Leu17, all'interno della sequenza del peptide β -amiloide, impedendo in tal modo la generazione dello stesso. In seguito al taglio α - secretasico, avviene il rilascio di

un grande frammento ammino-terminale che include tutto il dominio extracellulare di A β PP (sA β PP α), solubile, ed un corto frammento carbossi-terminale (C83) legato alla membrana, che include tutto il tratto transmembrana ed il corto dominio citosolico. C83 è substrato della γ -secretasi, che genera il peptide p3 (Haass et al., 1993; Selkoe, 1998), non aggregante e non neurotossico, ed un frammento AICD (A β PP intracellular domain) di 57 residui (Annaert et al., 2000; Cupers et al., 2001). La forma solubile di sA β PP α sembra agire come fattore autocrino, neuroprotettivo e forse anche neurotrofico. Il pathway amiloidogenico prevede che la β - secretasi tagli A β PP all'estremità ammino-terminale del peptide A β , generando una forma solubile di A β PP più corta, sAPP β e frammenti carbossi-terminali di 99 (C99) e 100 residui (C100) contenenti l'intera sequenza A β (detti CTFs). Tale frammento diviene substrato della γ -secretasi liberando il peptide β -amiloide ed il frammento AICD (A β PP intracellular domain); quest'ultimo è un peptide che corrisponde al dominio intracellulare dell'A β PP e sembra coinvolto nella regolazione genica. Il taglio più importante operato dalla γ -secretasi avviene a livello della Val40, determinando la generazione di A β 40, l'isoforma di A β più abbondante. Un altro taglio 2Aa più a valle, sempre operato dalla γ -secretasi, produce un frammento A β di 42 residui, detto A β 42, che rappresenta circa 10% del totale A β (Selkoe, 1998; Golde et al., 2003).

Negli ultimi anni, sono stati identificati altri due tipi di taglio di A β PP : un taglio, detto γ - secretasi-like, che porta alla produzione di AICD, avviene 7 Aa più a valle del sito di taglio della γ -secretasi che produce A β 42 (quindi più vicino all'interfaccia membrana/citosol), ed è stato chiamato taglio ϵ , dal momento che assomiglia al taglio γ -secretasi-like di Notch-1. Il secondo tipo di taglio avviene, invece, a livello di un altro sito tra l'Asp664 e Ala665, a valle di quello riconosciuto dalla γ -secretasi, su cui agisce una caspasi (probabilmente caspasi-3): tale taglio porta alla produzione di un peptide di 31 amminoacidi (C31), che è neurotossico per la cellula ed è un potente attivatore apoptotico. Altra via di processamento di A β PP identificata, indipendente da α - e β -secretasi, genererebbe frammenti N-terminali di 17 e 28 KDa (Zhang et al., 2011; Vella et al., 2012).

Funzioni. Nonostante gli intensi studi, la funzione di A β PP non è stata ancora ben definita. Topi KO per A β PP mostrano solo lievi difetti neurologici con diminuita capacità locomotoria, a dimostrazione che le funzioni di A β PP, A β PLP1 e A β PLP2 sono

ridondanti; inoltre neuroni primari derivanti da topi KO per A β PP mostrano una vita più corta ed una diminuita capacità a formare neuriti, suggerendo che A β PP possa avere una funzione nel trasporto assonale, nell'assogenesi e nel processo di arborizzazione dendritica (Senechal et al., 2008; Muller et al., 2012). Tra le altre funzioni di A β PP vi é quella trofica; nonché documentato é anche il suo coinvolgimento nella motilità cellulare assieme a Fe65, nella crescita neuronale, nell'adesione cellulare e nell'apoptosi (Thinakaran et al., 2008; Muller et al., 2012).

Essendo una proteina integrale di membrana ed in base alle analogie che la proteolisi intramembrana di A β PP ha con quella di Notch, é stato ipotizzato che A β PP possa svolgere anche una funzione recettoriale (Nizzari et al., 2012); gran parte degli studi si sono concentrati sul grosso dominio extracellulare e sull'identificazione di possibili ligandi, ma la ricerca non è stata molto fruttuosa. L'unico gruppo di proteine che certamente interagisce con le isoforme di A β PP che contengono il dominio Kunitz è quello delle LRP, proteine di membrana strettamente correlate al recettore delle lipoproteine a bassa densità (Fuentes et al., 2007; Holtzman et al., 2012).

Al contrario, molti dati sono oggi disponibili sul corto dominio citosolico di A β PP, che rappresenta il centro di un complesso sistema di interazioni proteina-proteina. Dati recenti mostrano che il dominio citoplasmatico dell'A β PP interagisce con le catene leggere della chinesina (Kamal et al., 2000) e che la chinesina, l'A β PP ed alcuni dei suoi frammenti carbossi-terminali potrebbero essere coinvolti nel trasporto assonale delle vescicole che contengono β -secretasi e presenilina (Kamal et al., 2001). Oltre a queste, sono state scoperte numerose altre proteine in grado di legare la regione C-terminale dell'A β PP, a livello della sequenza consenso ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ necessaria per l'internalizzazione, nonché strettamente coinvolta nella regolazione di interazioni intracellulari. Tale motivo é in comune con una serie di tirosin chinasi recettoriali (TKR) e non (TK); in particolar modo, il residuo di Tyr in questo motivo è fosforilato in seguito all'attivazione del dominio chinamico, cosicché tale motivo, diventato NPXpY, funziona da sito di attacco per proteine che posseggono un dominio detto dominio di legame alle fosfotirosine (PTB). Tra le proteine che posseggono il dominio PTB e che interagiscono con il motivo ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ della corta coda citosolica di A β PP abbiamo: X11 (Borg et al., 1996), Fe65 (Zambrano et al., 1997; Minopoli et al. 2007), mDab (Howell et al. 1997), c-Abl (Zambrano et al., 2001), Shc (Tarr et al., 2002; Russo et al., 2002), Jip1 (Scheinfeld et al. 2002), Numb (Roncarati

et al., 2002) e Grb2 (Nizzari et al., 2007; Russo et al., 2005). Tra tutte queste interazioni, quelle di Shc, Grb2 ed Abl richiedono che la Tyr682 del motivo ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ sia fosforilata; inoltre, il legame tra ShcA, Grb2 e AβPP è abnormemente aumentato nel cervello dei soggetti affetti da AD (Russo et al., 2002), suggerendo una possibile correlazione patogenetica. La fosforilazione dell'AβPP o dei suoi CTFs potrebbe, infatti, attivare, attraverso ShcA e Grb2, diversi meccanismi di trasduzione del segnale, la cui comprensione potrebbe avere un'implicazione sia nella funzione biologica di AβPP sia nel suo ruolo della patogenesi della Demenza di Alzheimer (Tarr et al., 2002a; Venezia et al., 2004) (Fig. 1).

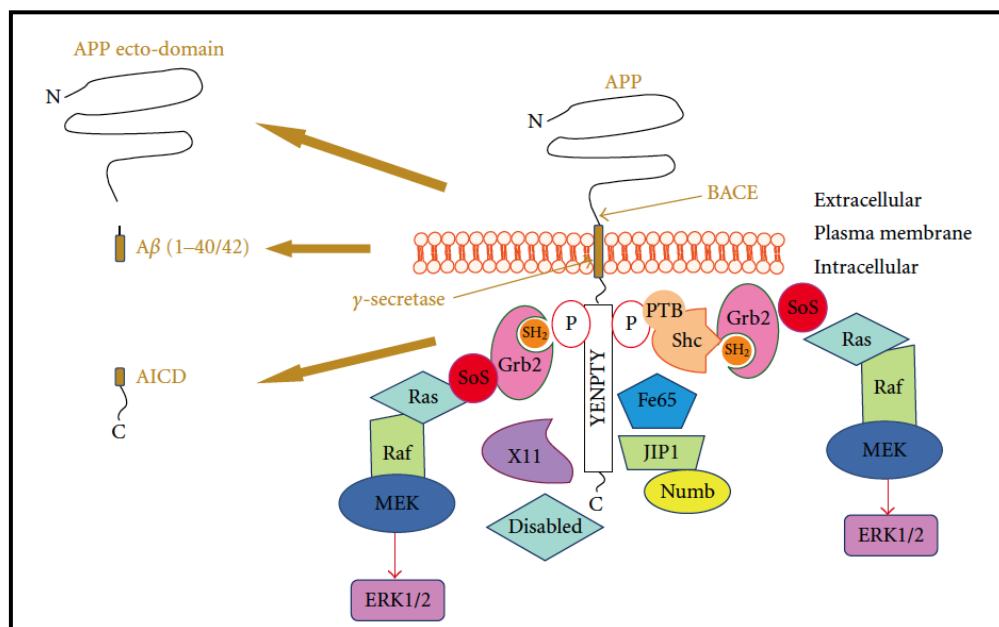


Fig. 1 - AβPP e proteine adattatrici coinvolte nella sua funzione di signaling intracellulare (Nizzari et al. 2012)

1.5.2 Preseniline 1 e 2 (PS1 e PS2)

PS1 e PS2 sono fosfoproteine con 8-10 domini transmembrana che si associano a nicastrina, APh-1 e PEN-2 per formare il cosiddetto complesso γ -secretasico. Questo è un complesso ad alto peso molecolare coinvolto nella produzione di β -amiloide attraverso il taglio dell'AβPP nella sua sequenza intramembrana (De Strooper, 2003).

Le PSs sono sintetizzate nell'ER e seguono la via secretoria: durante la maturazione sono sottoposte ad un taglio proteolitico all'interno delle regioni idrofobiche di un ampio anello citosolico tra il dominio transmembrana (TM) 6 e TM 7 originando frammenti attivi eterodimerici N- e C-terminali. Dopo l'endoproteolisi i frammenti PS1-NTF e PS1-CTF rimangono come eterodimeri e si localizzano principalmente nel Golgi, sulla superficie cellulare e nei compartimenti endocellulari. Le PSs appena sintetizzate subiscono processi di maturazione e glicosilazione lungo la via di secrezione. L'isoforma matura, altamente fosforilata, si accumula principalmente nel Golgi e può essere trasportata verso la superficie cellulare (De Strooper, 2003; Georgakopoulos et al., 1999). Una quota di PS si localizza anche nella membrana nucleare, nei cinetocori e nei centrosomi (Li et al., 1997).

Come già accennato inizialmente, PS1 e PS2 fanno parte di γ -secretasi, un complesso enzimatico ad alto peso molecolare costituito da quattro differenti proteine di membrana, le preseniline, nicastrina, Aph-1 e Pen-2 (De Strooper, 2003; Ahn et al., 2010). Tale attività è stata inizialmente identificata per il suo ruolo nella maturazione di A β PP e Notch, ma, ad oggi, sono state identificate ben 15 proteine transmembrana di tipo I ed un recettore multipasso transmembrana, bersagli di questa attività (APLP1 e 2, Erb4, E-caderina, LRP, CD44, p75NTR e tante altre). La γ -secretasi è una aspartil proteasi abbastanza insolita ed il suo dominio catalitico è uno delle questioni irrisolte più intriganti ed affascinanti in biologia negli ultimi anni. Infatti la γ -secretasi taglia i suoi substrati a livello del dominio transmembrana, in contrasto con la quasi totalità delle altre proteasi che sono incapaci di esplicitare la loro funzione in un ambiente altamente idrofobico, quale è quello del doppio strato lipidico, e di solito non tagliano i loro substrati quando questi si trovano in una conformazione elicoidale. Tra le componenti di γ -secretasi, la presenilina è stata la prima ad essere stata identificata (Wolfe et al., 1999).

Proteine ortologhe di presenilina sono state trovate in tutti i vertebrati, invertebrati ed anche nelle piante. In *C.elegans* sono stati identificati 3 membri della famiglia delle preseniline: Sel-12, che presenta il 42% di omologia con la PS1 umana, e Hop-1 e Spe-4, che invece presentano rispettivamente il 27% ed il 17% di omologia con PS1 umana; è stato inoltre provato che PS1 e PS2 umane possono vicariare la funzione di sel-12 in vermi mancanti di questa proteina, a dimostrazione della conservazione funzionale di tali proteine nell'evoluzione (Smialowska et al., 2006). Anche in *Drosophila melanogaster* ne è stato trovato l'omologo che presenta il 57% di omologia (Boulianne et al., 1997).

- **Geni e mutazioni. *Gain of function or loss of function?*** I geni di PS1 e PS2 nell'uomo si trovano sul cromosoma 14; ad oggi sono state identificate 185 mutazioni missenso nel gene di PS1 e 13 mutazioni nel gene di PS2 associate con casi di FAD (Cacquevel et al., 2012).

Dalla scoperta delle due preseniline e delle rispettive mutazioni correlate con lo sviluppo di AD familiare, i ricercatori hanno cercato di correlare il ruolo di tali proteine con i cambiamenti fenotipici riscontrati nei pazienti con AD e soprattutto con il taglio proteolitico di A β PP e con la formazione di A β (Selkoe, 2001; Gandy et al., 2001). Ci sono molti dati sperimentali che suggeriscono che le mutazioni nella sequenza delle preseniline causino un maggiore processamento di A β PP, con aumento della produzione della forma più lunga e più amiloidogena del peptide A β , ovvero l'A β 1-42, sostenendo fortemente l'ipotesi che un processamento anomalo di A β PP sia fondamentale per la patogenesi dell'Alzheimer (Borchelt et al., 1996; Scheuner et al., 1996; Citron et al., 1997; Murayama et al., 1999). Abbondanti depositi di A β 1-42 sono stati, ad esempio, trovati nei cervelli di individui con mutazioni sulle PSs, in fibroblasti di pazienti FAD; in animali transgenici che overesprimono geni mutati della PS1; in cellule trasfettate con PS1 mutata (Borchelt et al., 1996; Scheuner et al., 1996; Citron et al., 1997; Xia et al., 2000; Selkoe, 1998). Nei cervelli di soggetti con mutazione sulle PSs sono stati riscontrati livelli abnormemente elevati di ulteriori frammenti della A β , troncati ai residui 3 e 11 e ciclizzati a piroglutammato (A β pyro 3-42 e A β pyro 11-42). La presenza di tali frammenti correla con un fenotipo particolarmente severo e precoce con esordio intorno ai 40 anni. Si presume che i peptidi p3-42 e p11-42 possano assumere conformazioni diverse dai peptidi interi 1-42 e 1-40 e che possano indurre la formazione di oligomeri tossici mantenendoli più a lungo attivi (Russo et al., 2000; Russo et al., 2001, Russo et al., 2002).

Tutti questi dati sostengono pertanto l'ipotesi che mutazioni sul gene di presenilina comportano un guadagno di funzione di quest'ultima e hanno, altresì, rafforzato l'ipotesi dell'amiloide incentrandola ancora di più sulla funzione di A β 42 e mostrano che le PSs potrebbero essere inserite nella teoria della cascata dell'amiloide per spiegare l'eziologia e la patogenesi della AD. Questa teoria ha due implicazioni: 1) che la causa scatenante della AD sia riconducibile principalmente alla deposizione di amiloide e 2) che i trattamenti volti a diminuire la produzione di A β potrebbero essere efficaci.

Diverse evidenze sperimentali hanno tuttavia proposto una chiave di lettura diversa secondo la quale mutazioni su presenilina determinerebbero una perdita di funzione o “*loss of function*” della stessa (Shen and Kelleher, 2007; Heilig et al, 2010; De Strooper, 2007; Wolfe, 2007; Chávez-Gutiérrez 2012; Shioi et al., 2007). 1- Topi knock-out condizionali in cui è stata deleta PS1 hanno manifestato degenerazione neuronale e NFTs in assenza di amiloide (Saura et al, 2004), mentre modelli murini basati sull’overproduzione di A β non hanno mostrato indurre neurodegenerazione (Irizarry et al., 1997); 2- mutazioni su PS sono state trovate in forme di demenza frontotemporale che non mostrano amiloidosi (Raux et al., 2000; Amtul et al., 2002; Dermaut et al., 2004); 3- l’immunizzazione attiva o passiva contro A β ha mostrato che la riduzione del carico cerebrale di amiloide non corrisponde ad una riduzione della gravità della demenza (Ferrer et al., 2004).

Questi dati supportano l’idea che le mutazioni su Presenilina potrebbero portare neurodegenerazione attraverso meccanismi diversi dalla produzione di A β ; possibilità supportata dal fatto che l’aumentata produzione di A β 1-42 indotta dai mutanti FAD potrebbe non essere correlata con l’età di insorgenza della malattia causata da queste mutazioni (Scheuner et al., 1996; Citron et al., 1997). Inoltre, recenti lavori sembrano essere discordanti riguardo le proporzioni di A β 1-40, A β 1-42 e del frammento AICD risultanti dalle mutazioni su Presenilina; alcuni riportano, ad esempio, che l’aumentato rapporto tra A β 1-42/1-40 in mutanti di Presenilina sia dovuto ad una ridotta produzione di A β 1-40; tali mutanti mostrerebbero, inoltre, un accumulo di frammenti C-terminali di A β PP, substrato di γ -secretasi, ed una ridotta produzione del frammento C-terminale AICD, rafforzando quindi l’ipotesi che le mutazioni su Presenilina determinano una perdita di funzione dell’attività γ -secretasica nei confronti di A β PP (Benthair et al., 2006; Kumar-Singh et al., 2006; Wiley et al., 2005; Walker et al., 2005).

- **Trasduzione del segnale.** Oltre al loro coinvolgimento nella formazione dell’A β , le PSs intervengono in differenti meccanismi di trasduzione del segnale mediati da recettori/trasduttori che regolano diversi processi intracellulari: il traffico intermembrana, il signaling di Notch, la plasticità neuronale, la regolazione dell’omeostasi del calcio, l’adesione cellulare, l’apoptosi ed il ciclo cellulare (De Strooper et al., 2010).

Uno dei meccanismi molecolari in cui presenilina è coinvolta è il meccanismo di trasduzione del segnale di Wnt che controlla molti eventi durante l’embriogenesi e regola

la morfologia, la proliferazione e la motilità della cellula. La β -catenina citosolica è un mediatore centrale del signaling di Wnt e il suo trafficking è mediato dalla chinasi GSK $3\alpha/\beta$ direttamente modulata da Wnt. La PS1 apparentemente stabilizza il complesso caderina/ β -catenina per promuovere l'adesione cellula-cellula, mentre il taglio PS1/ γ -secretasico del complesso di adesione E-caderina/ β -catenina incrementa la quota del pool citosolico di β -catenina aumentandone la degradazione ed annullando la funzione trascrizionale della stessa. In questo scenario, una eventuale "loss of function" di presenilina potrebbe quindi essere correlata con un aumento dell'attività trascrizionale di β -catenina attraverso la disattivazione di GSK $3\alpha/\beta$. Si può evidenziare anche come GSK- $3\alpha/\beta$ sia apparentemente coinvolta anche nella metabolizzazione dell'A β PP, in quanto l'inibizione di GSK- $3\alpha/\beta$ da parte del Litio riduce la produzione di A β (Phiel et al., 2003). PS1 è altresì essenziale per un corretto trafficking della N-caderina dall'ER alla membrana plasmatica e per il taglio γ ed ϵ della E-caderina (Marambaud et al., 2002). Il significato di questo meccanismo per lo sviluppo dell'AD è tuttora sconosciuto.

Le PSs sono anche fondamentali per il metabolismo di Notch, recettore coinvolto nella regolazione del destino della cellula, del differenziamento cellulare, della proliferazione, dell'apoptosi e della neurodegenerazione (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Nello specifico, Notch viene tagliato da γ -secretasi producendo un frammento C-terminale (NICD: Notch intracellular domain) che trasloca nel nucleo dove attiva la famiglia CSL dei fattori di trascrizione (Kopan and Goate, 1999).

Altro substrato di PS1 è CD44, una molecola la cui funzione è quella di promuovere l'adesione a livello della superficie cellulare dei componenti della matrice extracellulare, nonché quella di regolare la crescita delle cellule tumorali e le metastasi (Murakami et al., 2003).

La PS1 può anche modulare l'attività del livello basale della MAP Kinasi ERK1,2 attraverso un meccanismo dipendente da Raf e MEK (Kim et al., 2005), agendo quindi indirettamente nella crescita, nella proliferazione, nella sopravvivenza e nel differenziamento cellulare. Oltre ad ERK1/2, PS1 sembra essere un importante regolatore della via PI3K/Akt/GSK- 3β . In totale opposizione ai dati ottenuti nel nostro laboratorio riportati nella presente tesi (paragrafo 3.5.2), alcuni lavori attribuiscono a presenilina il ruolo di attivatore di Akt e quindi, indirettamente, inattivatore di GSK-3; secondo tali

studi, mutazioni su PS1 inibirebbero quindi l'attivazione di tale pathway segnale inducendo l'iperfosforilazione di tau da parte di GSK3 α - β (Baki et al., 2004).

Altro ruolo assegnato a Presenilina 1 è quello di modulatore del processo autofagico. Presenilina 1 sembrerebbe legare la subunità V0a1 dell'ATPasi vacuolare a livello del reticolo endoplasmatico facilitandone la N-glicosilazione da parte della subunità STT3B del complesso oligosaccariltrasferasico (OST) e favorendone il trasporto verso i lisosomi. Mutazioni su PS1 responsabili della forma ad insorgenza precoce dell'AD sembrerebbero alterare tale processo autofagico, determinando l'accumulo patogenetico di proteine e la morte neuronale (Lee et al., 2010; Neely et al., 2011). D'altronde, la regolazione del processo autofagico mediata da PS potrebbe avvenire anche attraverso il pathway segnale PI3K, il quale è stato dimostrato avere un ruolo nella formazione delle vescicole autofagiche (Neely et al., 2011).

L'omeostasi del calcio è un altro processo regolato da presenilina attraverso i recettori IP(3), i recettori della rianodina e le pompe SERCA (Woods et al., 2012).

Altro importante ruolo svolto dalle preseniline è nel meccanismo apoptotico, dal momento che i mutanti FAD causano la morte cellulare o inducono eventi secondari che possono portare all'apoptosi (Thinakaran and Parent, 2004). Gli animali in cui i geni PS1 e PS2 sono deleti mostrano deficit nell'apprendimento, nella memoria, nelle funzioni sinaptiche e morte neuronale (Saura et al., 2004). I processi a valle di questi effetti sono sconosciuti, ma la scoperta che PS1 interagisce con membri antiapoptotici della famiglia di Bcl-2 potrebbe indicare un probabile meccanismo d'azione (Alberici et al., 1999).

Dati i molteplici processi intracellulari nei quali Presenilina è coinvolta, non sorprende il fatto che tale proteina interagisca con numerose altre proteine. Oltre ad interagire con i componenti del complesso γ -secretasico, Presenilina stabilisce, infatti, legami anche con proteine non appartenenti a tale complesso ma ugualmente critiche per la produzione di A β (Verdile et al., 2007). PS1 interagisce inoltre con Grb2, la proteina adattatrice precedentemente identificata come A β PP-binding protein, suggerendo che A β PP e PSs parteciperebbero allo stesso meccanismo di trasduzione del segnale volto alla regolazione di ERK1/2 (Nizzari et al., 2007; Russo et al., 2005). Altro interattore identificato di Presenilina è LRP (low density receptor-related protein) il quale sembra competere per il taglio γ -secretasico con A β PP e quindi influenzare ad ogni modo la produzione di A β (Lleó A et al., 2005).

1.5.3 Tau

Tau fu in principio scoperta nel 1975 da Weingarten et al. (Weingarten. et al. 1975) come una proteina che copurificava con i microtubuli e fu chiamata appunto tau per la sua abilità di indurre “*tubule formation*”. L’interesse per tau inizialmente fu moderato finchè fu dimostrato che tau iperfosforilata costituiva i “*Paired Helical Filaments*” (PHFs) che rappresentano il “core” dei “*NeuroFibrillary Tangles*” (NFTs) in AD (Kosik et al., 1986; Grundke-Iqbal I. et al., 1986; Iqbal et al., 2008) sollevando un grande ed immediato interesse da parte della comunità scientifica.

La formazione dei *tangles* sembra essere il meccanismo finale che porta alla morte neuronale e possibilmente alla demenza, principale sintomo dell’AD. La tau isolata da questi aggregati è molto fosforilata: circa quattro volte di più della tau estratta dal tessuto cerebrale dei soggetti non dementi. Si ritiene che in normali condizioni fisiologiche, tau sia in costante equilibrio dinamico con i microtubuli e che l’affinità della proteina per i microtubuli sia principalmente controllata dal suo stato di fosforilazione. In condizioni patologiche, l’equilibrio di legame di tau ai microtubuli è perturbato causando un aumento dei livelli citosolici della frazione non-legata della proteina, la quale è così più esposta al taglio proteolitico da parte di diverse proteasi cellulari e/o a profondi cambiamenti conformazionali culminanti in aggregazione e formazione dei grovigli neurofibrillari (Ballatore et al., 2007; Lasagna-Reeves et al., 2012).

Le conseguenze patologiche di tale cascata di eventi indurrebbero i) la perdita delle normali funzioni cellulari di tau con conseguente disassemblaggio dei microtubuli, compromissione del trasporto assonale, disfunzione sinaptica e morte neuronale (perdita di funzione o *loss of function*); ii) l’acquisto di nuove funzioni tossiche da parte di forme tronche iperfosforilate della proteina stessa (acquisto di funzione o *gain of function*) che da un lato sequestrano il pool endogeno di tau legato ai microtubuli e dall’altro assemblano in aggregati proteinacei insolubili che interferiscono stericamente con i normali meccanismi di traffico intracellulare (Ward et al. 2012; Halliday et al., 2012; Avila et al., 2013).

- **Localizzazioni intracellulari di tau e rispettive funzioni.** La proteina tau appartenente alla famiglia delle proteine associate ai microtubuli (*Microtubule Associated Protein* MAPs) è una fosfoproteina principalmente espressa, anche se non esclusivamente, nei neuroni. È stata, infatti, trovata anche in molti altri tessuti periferici come il cuore, il rene, il muscolo, il pancreas, i linfoblasti ed i fibroblasti (Thurston et al., 1996; Ingelson et al., 1996).

Sebbene tau sia descritta principalmente come una proteina citosolica dove risulta associata ai microtubuli assonali e somatodendrici (Binder et al., 1985; Butner et al., 1991) tau, in realtà, ha molteplici localizzazioni intracellulari che riflettono le sue diverse funzioni.

In veste di proteina associata ai microtubuli, tau garantisce la corretta citoarchitettura neuronale promuovendo l'assemblaggio e la stabilizzazione dei microtubuli citoscheletrici, nonché regola la crescita neuritica, il trasporto assoplasmatico, la polarità e la forma assonale. Ruolo meno noto della tau citoplasmatica è quello di proteina scaffold che la coinvolge in diverse ed importanti vie di trasduzione del segnale intracellulare (Johnson and Stoothoff., 2004; Morris et al. 2011).

Oltre a livello citoplasmatico, tau è stata identificata a livello della membrana neuronale, dove sembra far parte di complessi associati alla membrana; poiché tale associazione avviene attraverso il dominio N-terminale, diverso da quello utilizzato per l'interazione con i microtubuli, è stata proposta una funzione linker tra tale compartimento cellulare ed i microtubuli (Brandt et al., 1995). Altra localizzazione osservata è quella ribosomale, identificata sia in soggetti sani che malati di Alzheimer (Binder et al. 1995; Papasozomenos and Binder 1987). Infine, non ben definito è il ruolo della tau nucleare, identificata sia in cellule neuronali (Loomis et al., 1990; Wang et al., 1993; Brady et al., 1995) che non neuronali (Thurston et al., 1996).

- **Tau nucleare.** Il segnale di tau a livello nucleare appare molto intenso, puntinato e circoscritto a livello di piccoli organelli privi di membrane detti “*nuclear puncta*” o “*nuclear speckles*” corrispondenti a domini nucleari localizzati nelle regioni intercromatiniche del nucleoplasma delle cellule eucariotiche. La tau nucleare è stata identificata durante l'interfase, nella regione fibrillare densa del nucleolo, sede della trascrizione dell'rRNA e, durante la mitosi, a livello degli organizzatori nucleolari dei

cromosomi umani acrocentrici (locus dei geni dell'rRNA) (Loomis et al., 1990; Thurston et al., 1996); quest'ultima localizzazione suggerisce un ruolo di tau nella riformazione del nucleolo e nella biogenesi dei ribosomi e/o nella loro funzione.

È stato, inoltre, dimostrato un legame tra tau ed il DNA a singolo e a doppio filamento (Hua and He, 2003; Krylova et al., 2005), dove tale legame dipenderebbe dallo stato di fosforilazione e di aggregazione di tau (Hua and He, 2002); tau aggregata o fosforilata non sarebbe, infatti, più in grado di legare il DNA. Il significato fisico del legame di tau al DNA non è stato, tuttavia, ancora stato chiarito (Hua et al., 2003). Fra le ipotesi vi è un ruolo protettivo di tau contro eventi di danno al DNA, come lo stress ossidativo acuto e lo stress termico (Sultan et al., 2011). Inoltre, l'identificazione del legame di tau al DNA satellite pericentromerico nucleolare lascia ipotizzare ad una sua partecipazione nella conformazione della struttura nucleolare e/o nell'eterocromatizzazione di una parte dei geni ribosomali (Sjoberg et al. 2006). Questa ipotesi è rafforzata dal fatto che tau co-localizza a livello del nucleolo con la nucleolina che è una delle principali proteine organizzatrici nucleolari.

Tau co-localizza, inoltre, con i centrosomi dove sembrerebbe regolare l'assemblaggio dei microtubuli (Lu et al., 1993; Cross et al., 1996). Al riguardo, nel presente lavoro, la figura 11B dimostra chiaramente la localizzazione di tau fosforilata a livello dell'epitopo AT100 (p-T212-pS214) nei centrosomi di cellule in metafase, profase e telofase (tale localizzazione non è stata da noi osservata per altri fosfo-epitopi di tau).

La relazione tra la proteina tau dei PHF nei casi AD e la tau nucleare non è immediatamente ovvia. È stato riscontrato che, in analogia con la tau degli aggregati neurofibrillari, la tau nucleare è altamente insolubile in SDS (richiedendo pertanto la solubilizzazione con acido formico per poter essere visualizzata in immunoblotting) (Loomis et al., 1990; Selokoe et al., 1982). Inoltre, gli aggregati neurofibrillari sono stati trovati anche nella regione perinucleare e intranucleare cellulare (Metuzals et al., 1988).

- **Struttura e isoforme.** Nel cervello umano adulto sono espresse sei diverse isoforme della proteina tau. Tali varianti originano dallo splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10 dell'unico mRNA trascritto da un gene a copia singola sito sul cromosoma 17q21. Tali isoforme variano dai 352 ai 441 aa in lunghezza, con un peso molecolare apparentemente compreso tra i 50 e i 70 kDa. Da un punto di vista strutturale, tau è una proteina modulare

in quanto è caratterizzata: (i) da una regione acida amino-terminale seguita da una regione basica, più distale e ricca in prolina, che è normalmente chiamata “dominio di proiezione” in quanto legante la membrana plasmatica; (ii) da un dominio di interazione ai microtubuli, che è costituito da motivi conservati ripetuti di legame alla tubulina e comprende la porzione carbossi-terminale della proteina (Lee et al., 1988; Goedert et al., 1989; Himmler et al., 1989; Buee et al., 2000). L’affinità di tau per i microtubuli dipende (i) dal numero di ripetizioni carbossi-terminali leganti i microtubuli citoscheletrici (R1-R4); (ii) dall’interazione con la membrana plasmatica; (iii) dalle sequenze basiche ricche in prolina fiancheggiando i domini ripetuti R1-R4; (iv) dallo stato di fosforilazione. Le sei isoforme differiscono l’una dall’altra i) nel numero di ripetizioni leganti la tubulina di circa 31-32 Aa, che possono essere tre (3R-tau) o quattro (4R-tau); ii) dall’assenza (0N) o presenza di uno (1N) o due (2N) inserti di 29 Aa nella porzione amino-terminale della proteina non direttamente coinvolti nel legame ai microtubuli (Ballatore et al., 2007). Nel cervello umano adulto, il rapporto tra le isoforme 3R e 4R è circa 1 e le isoforme 1N, 0N e 2N comprendono circa il 54%, 37% e 9%, rispettivamente della tau totale. Ciascuna di queste isoforme ha probabilmente un particolare ruolo fisiologico poichè sono differenzialmente espresse durante lo sviluppo. Infatti nel cervello fetale è espressa solo l’isoforma più corta (3R/0N), mentre nel cervello adulto sono rappresentate tutte le altre 6 isoforme. Inoltre, esiste un’isoforma della proteina tau con un alto peso molecolare (120kDa) che è espressa esclusivamente nei neuroni del sistema nervoso periferico e che contiene un esone addizionale nella porzione amino-terminale (Shahani and Brandt, 2002). Tau è una fosfoproteina e la regolazione in base allo sviluppo si estende anche al grado di fosforilazione: la tau fetale, infatti, può essere fosforilata in più siti rispetto alla tau adulta.

- **Fosforilazione e defosforilazione.** Mappando i siti di fosforilazione dei PHF-tau, tramite spettrometria di massa, si è notato che molti dei residui fosforilati sono in sequenze Ser-Pro/Thr-Pro situati principalmente nelle regioni ricche di prolina (Morishima-Kawashima and Kosik, 1996). Alcuni di questi siti possono essere rivelati con anticorpi che riconoscono la tau solo se fosforilata. La tau proveniente dai PHFs dei casi di AD migra in tre bande di apparente peso molecolare di 60, 64 e 68 kDa (Greenberg and Davies, 1990). La defosforilazione genera sei bande, indicando che la PHF-tau è formata da tutte le sei isoforme in un anomalo stato di fosforilazione (Goedert et al., 1992). Nell’AD, almeno 30 residui di serina/treonina sono fosforilati (Morishima-Kawashima et

al., 1995) e le chinasi maggiormente coinvolte nella fosforilazione abnorme di tau nella AD sembrano essere GSK3 β , cdk5, CaM-kII. La famiglia delle MAPK chinasi (mitogen-activated-protein kinase), che include ERK1, ERK2, p70S6 chinasi e le protein chinasi attivate da stress, JNK e p38 chinasi, sono note fosforilare tau ad alcuni siti presenti nell'AD ed inoltre l'attivazione di tali enzimi associa con la progressione della neurodegenerazione fibrillare (Pei et al., 2002; Stoothoff et al, 2005). L'iperfosforilazione di tau osservata nei cervelli di soggetti affetti da AD può essere dovuta sia ad una maggiore attivazione delle chinasi, quali ad esempio la MAPK ERK1,2 sia ad una ridotta attività delle fosfatasi, tra cui ad esempio PP2A (protein Ser/Thr phosphatase type 2A). PP2A è un oloenzima eterotrimerico, che esiste in diverse isoforme composte da una struttura centrale comune, legata a differenti subunità regolatrici. Il cuore dell'enzima è un complesso tra la subunità catalitica (C) e la subunità strutturale (A). Una terza classe di subunità, chiamata B, comprende parecchi polipeptidi che regolano l'attività e la specificità di PP2A. Altre serin/treonin protein-fosfatasi regolatrici della fosforilazione di tau sono PP1A e PP2B; in minor misura anche PP1. Nello specifico, è stato riscontrato che l'attività di PP2A e PP1A è significativamente diminuita di circa il 20-30% nel cervello di pazienti affetti da AD; il ruolo di PP2A nella defosforilazione di tau è, inoltre, supportato dall'osservazione che PP2A localizza nei microtubuli dove è direttamente legata a Tau (Liu et al., 2005; Wang et al., 2007).

- *Ipotetici meccanismi di degradazione della proteina tau.* Il meccanismo di degradazione della proteina tau non è stato ancora ben elucidato; al riguardo gli studi sono pochi e talvolta contrastanti. L'accumulo di tau allo stato fosforilato negli aggregati neurofibrillari rappresenta una delle caratteristiche principali della malattia di Alzheimer e di altre tautopatie, incluso le demenze fronto-temporali (Jucker et al., 2011). È nota l'azione proteolitica di tau da parte di varie proteasi in vitro, tra cui le caspasi (Canu et al. 1998), le calpaine (Yang and Ksiezak-Reding 1995), le cathepsine (Kenessey et al. 1997) e la trombina (Olesen 1994). Alcuni PHFs contengono tau troncata ubiquitinata a livello N-terminale (Morishima-Kawashima et al. 1993); ma riguardo al ruolo del proteasoma nella loro degradazione non si hanno dati chiari (David et al., 2002). Secondo un'ipotesi di degradazione alternativa tau viene invece degradata mediante il meccanismo autofagico (Caccamo et al., 2013). È stato dimostrato come in un modello murino esprimente l'isoforma umana di tau 4R0N portatrice della mutazione P301S, associata alla FTDP-17,

la stimolazione di mTOR possa indurre il meccanismo autofagico, riducendo le inclusioni intracellulari di tau caratterizzanti il modello murino (Schaeffer et al., 2012; Nassif et al. 2012). Stesso meccanismo di degradazione è stato osservato in un altro modello murino transgenico per la tau umana (TauRD) portatrice della mutazione $\Delta K280$ associata anch'essa alla FTDP-17. Tale modello è caratterizzato dalla formazione di aggregati neurofibrillari che sono stati associati ad un elevato effetto tossico. È stato dimostrato che stimolando la clearance degli aggregati mediante il processo autofagico, si può raggiungere una reversione dell'effetto tossico degli stessi (Wang et al., 2010).

1.6 Etiopatogenesi dell'AD: ipotesi a confronto

1.6.1 Ipotesi dell'amiloide

Il peptide A β 1-42, non è solo il costituente biochimico principale delle placche senili, ma gioca anche un importante ruolo nell'eziopatogenesi della malattia. Sulla base dell'ipotesi più accreditata, quella dell'amiloide, l'evento scatenante la patologia sarebbe l'accumulo nel cervello del peptide neurotossico A β (in forma fibrillare o oligomerica) conseguente ad uno squilibrio tra la sua produzione e/o rimozione, portando in ultimo alla degenerazione neuronale e alla demenza clinica (Hardy and Selkoe, 2002). Tale ipotesi è supportata dalle seguenti evidenze sperimentali: i) le mutazioni a carico di A β PP e di presenilina 1 o 2, geneticamente associate a casi familiari di AD, portano ad un aumento della produzione e/o dell'accumulo di specie A β 1-42, considerate le più neurotossiche; ii) persone affette da sindrome di Down (trisomia del cromosoma 21), che possiedono una terza copia di questo cromosoma, sviluppano placche di A β in fasi precoci della loro vita; iii) in alcuni soggetti con mutazioni nella regione di promozione di A β PP si ingenera una sovrapproduzione di A β PP (Rovelet-Lecrux et al., 2006). Diversamente da quanto si riteneva inizialmente, fu dimostrato che gli oligomeri solubili e diffusibili di A β , ma non le placche extracellulari insolubili, sono gli effettivi mediatori e perpetuatori del processo neurodegenerativo. L'A β solubile subirebbe una serie di cambiamenti conformazionali (*misfolding*) con acquisizione di una struttura β -sheet che la renderebbero più prona ad aggregarsi in oligomeri/polimeri insolubili costituenti il *core* delle placche extracellulari.

La neurotossicità degli oligomeri solubili di A β è dimostrata anche dalla loro capacità di inibire il potenziamento a lungo termine (LTP *Long-Term Potentiation*), di causare disfunzione mitocondriale e stress ossidativo, di alterare l'omeostasi ionica intracellulare, di indurre iperfosforilazione di tau e disassemblaggio dei microtubuli con conseguente compromissione del trasporto assonale, provocando infine eventi abortivi del ciclo cellulare (Blennow et al., 2006; Reddy, 2009).

1.6.2 Ipotesi del ciclo cellulare

Nonostante i numerosi dati sperimentali che supportano l'ipotesi dell'amiloide, ricerche più recenti hanno messo in dubbio la veridicità di tale ipotesi. La mancata correlazione tra il numero di placche e la severità della malattia, il mancato effetto di trials sperimentali di vaccinazione verso il peptide A β che hanno mostrato ridurre in parte le placche senza una sostanziale reversione del fenomeno, modelli murini knock-out per Presenilina 1 che hanno mostrato morte neuronale ed iperfosforilazione di tau senza placche amiloidogeniche, hanno lasciato formulare ipotesi alternative per cercare di correlare i diversi processi neuropatologici (Hardy, 2009; Zhu et al., 2004). Una delle teorie parallele e complementari a quella dell'amiloide, definita come "ipotesi del ciclo cellulare", suggerisce che A β PP potrebbe indurre neurodegenerazione agendo come un recettore di superficie, il quale, attraverso l'interazione con proteine adattatrici, potrebbe modulare un pathway segnale non ancora completamente chiarito, la cui alterazione potrebbe distruggere l'omeostasi neuronale, causare danno neuronale ed indurre la riattivazione del ciclo cellulare in neuroni post-mitotici, inducendo infine la morte neuronale (Venezia et al. 2007; Nizzari et al., 2007; Zhu et al. 2004; Woods et al., 2007; Lopes et al., 2009; Bonda et al., 2010; Moh et al., 2011). D'altronde l'ipotesi che A β PP possa modulare un signaling intracellulare non è impossibile date le sue confermate caratteristiche recettoriali e le interazioni stabilite con proteine adattatrici coinvolte in pathway di trasduzione del segnale intracellulare (Nizzari et al., 2012).

A sostegno dell'ipotesi del ciclo cellulare vi sono dati sperimentali che dimostrano che i neuroni presenti nel cervello di soggetti affetti da AD tentino una riattivazione del ciclo cellulare prima di morire e che eventi associati all'aneuploidia (Boeras et al., 2008; Raina et al., 2004) e difetti del ciclo cellulare, come la scorretta segregazione dei cromosomi e la trisomia 21, siano correlati con la presenza di mutazioni su A β PP e PS. Osservazioni

sempre più numerose suggeriscono che un'aberrante attivazione del ciclo cellulare possa indurre la formazione di *tangles* neurofibrillari con iperfosforilazione della proteina tau nei cervelli di soggetti AD. Ad esempio il complesso p25/cdk5 iperfosforila Tau e riduce la sua capacità di legarsi ai microtubuli (Patrick et al., 1999). Diverse evidenze sperimentali supportano la correlazione tra l'iperfosforilazione della proteina tau e l'anormale rientro nel ciclo cellulare di neuroni post-mitotici di soggetti affetti da AD:

1. la tau proveniente dai tessuti cerebrali fetali, ancora in grado di dividersi, ha un elevato contenuto di fosfato che viene riconosciuto da anticorpi specifici (Illenberger et al., 1998); in parecchie linee cellulari la fosforilazione di tau viene specificamente aumentata durante la mitosi (Pope et al., 1994; Preuss et al., 1998; Illenberger et al., 1998);

2. è stato dimostrato uno stretto legame tra l'apoptosi ed i meccanismi del ciclo cellulare; l'induzione della mitosi in cellule neuronali post-mitotiche porta inevitabilmente alla morte cellulare (Raina et al., 2004);

3. i livelli di apoptosi sono elevati nei tessuti cerebrali ippocampali nei casi di AD (Raina et al., 2004);

4. sono state evidenziate anomalie cromosomiche e genetiche quali trisomie e aneuploidie localizzate in neuroni postmitotici nell'adulto, ed in particolare in soggetti affetti da AD, suggerendo un possibile tentativo di duplicazione genetica (Geller et al., 1999; Boeras et al., 2008).

L'attuale ipotesi per la fosforilazione di tau e l'attivazione del ciclo cellulare, sostiene che i neuroni di soggetti affetti da AD provino a rientrare in una fase proliferativa come risultato di qualche stimolo sconosciuto e questo porterebbe le cellule verso il collasso del citoscheletro o verso l'apoptosi spiegando la massiva morte dei neuroni nei cervelli di soggetti affetti da AD.

In accordo con quanto finora esposto, a livello dei neuroni corticali di pazienti affetti da Alzheimer si documentano elevati livelli di marcatori del ciclo cellulare che dimostrano la tendenza a spostarsi dalla fase di quiescenza verso una fase di divisione cellulare. Tali marcatori consistono in un accumulo di cicline, di chinasi ciclina-dipendenti e di inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (Delobel et al., 2006; Modi et al., 2012). Una molecola di interesse fra le chinasi ciclina-dipendenti (Cdks) è Cdk5, proteina priva di funzioni note nell'ambito del ciclo cellulare, ma che appare particolarmente espressa nei neuroni post-mitotici (Monaco et al, 2005). Un'alterazione di regolazione di Cdk5, porterebbe secondo

alcuni autori, all'attivazione di p38 e conseguentemente all'aumentata espressione di c-Jun, che in ultima analisi contribuirebbe significativamente alla neurodegenerazione nell'Alzheimer (Chang et al, 2012). È stata, inoltre, identificata una regione di *linkage* a livello di 9p21.3 nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer ad esordio tardivo (*late-onset* AD). Tale regione contiene CDKN2A, che regola la progressione verso la fase G1 del ciclo cellulare e che potrebbe rappresentare un fattore di suscettibilità per la malattia di Alzheimer (Zuchner et al, 2008).

1.7 Razionale della ricerca

In questo scenario risalta il fatto che tau sia fisiologicamente fosforilata durante la mitosi (Delobel et al., 2002), mentre la dis-regolazione della sua fosforilazione è associata ad eventi patologici e l'AD è sicuramente uno di questi. L'ipotesi da cui trae origine il lavoro di ricerca della presente tesi, si basa sull'idea che nei casi AD l'iperfosforilazione di tau, oltre a determinarne il distacco dai microtubuli e la conseguente aggregazione sotto forma di *tangles*, induca in neuroni post-mitotici l'aberrante riattivazione del ciclo cellulare precedente e scatenante la morte di questi ultimi. La teoria del ciclo cellulare, teoria parallela e complementare all'ipotesi dell'amiloide, attribuisce ad A β PP un ruolo recettoriale mediante il quale tale proteina modulerebbe un pathway segnale non ancora completamente identificato, la cui alterazione potrebbe distruggere l'omeostasi neuronale, causare danno neuronale ed indurre la riattivazione del ciclo cellulare in neuroni post-mitotici, inducendone infine la morte (Venezia et al. 2007; Nizzari et al., 2007; Zhu et al. 2004; Woods et al., 2007; Lopes et al., 2009; Bonda et al., 2010; Moh et al., 2011). In tale quadro neurodegenerativo la fosforilazione di tau rappresenterebbe l'ultimo evento molecolare del signaling intracellulare mediato da A β PP, nonché il meccanismo chiave dell'aberrante rientro neuronale nel ciclo cellulare. Oltre alle diverse evidenze sperimentali supportanti la correlazione tra l'iperfosforilazione della proteina tau e l'anormale rientro nel ciclo cellulare di neuroni post-mitotici di soggetti affetti da AD (Preuss et al., 1998; Illenberger et al., 1998; Keeney et al., 2012), è stato dimostrato al riguardo che A β PP regola i livelli di fosforilazione di ERK1/2 e l'andamento della proliferazione cellulare, e

che l'interazione tra A β PP e Grb2 è considerevole nelle cellule in proliferazione, nonché aumentata a livello corticale nei soggetti affetti da AD (Nizzari et al., 2007).

In questo scenario, si deve considerare che anche PS1 interagisce con Grb2 e modulerebbe l'attività della chinasi ERK1/2 attraverso un meccanismo dipendente da Raf e MEK, nonché attraverso la via PI3K/Akt/GSK-3 α/β (Nizzari et al., 2007). La nostra ipotesi prevede quindi che sia A β PP sia PS1 partecipino allo stesso meccanismo di trasduzione del segnale attraverso Grb2. Dati recenti mostrano che Grb2 attraverso l'interazione con A β PP e con PS1, regola la chinasi ERK1/2 in particolare durante la mitosi (Venezia et al., 2007; Nizzari et al., 2007). In modo dipendente da BACE 1, Grb2 è, infatti, il principale modulatore della trasduzione del segnale delle MAPK e anche di quella di PI3K (Yamazaki et al., 2002) e, considerando che alcuni fosfoepitopi patogenici di tau sono normalmente attivati nelle cellule proliferanti durante il ciclo mitotico (Illenberger et al., 1998; Lambourne et al., 2005; Yoshida and Goedert, 2006; Zheng-Fischhofer et al., 1998; Vincent et al., 1998; Yang et al., 2006), l'ipotesi è che A β PP e Presenilina possano contribuire alla regolazione della fosforilazione di tau, molto probabilmente attraverso Grb2, e che una modulazione anormale di questo segnale possa, in ultima analisi, portare a meccanismi neurodegenerativi.

Parte del lavoro di questa tesi è stato pubblicato sul *Journal of Alzheimer Disease*, "Amyloid-protein precursor regulates Phosphorylation and cellular compartmentalization of microtubul associated protein Tau", in cui abbiamo dimostrato che l'overespressione di A β PP può indurre una cascata di trasduzione del segnale che induce un'anormale attivazione di MAPK ERK1,2 ed una aumentata crescita cellulare (Nizzari et al., 2007; Nizzari et al., 2012). In questa tesi presentiamo altresì ulteriori dati approfondendo questo aspetto, evidenziando come l'overespressione di A β PP, o il blocco del suo normale processamento indotto da una "loss of function" di PS, moduli la distribuzione di fosfo-tau tra i pools citoscheletrico e nucleare; tale step molecolare potrebbe essere richiesto sia per la regolazione del ciclo cellulare (Vincent et al., 1998; Preuss 1998; Illenberger et al., 1998) sia per la formazione di aggregati neurofibrillari, entrambi marcatori neuropatologici caratterizzanti la malattia di Alzheimer.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari

Le linee cellulari utilizzate in questo studio sono state:

- MEF (*mouse embryonic fibroblasts*) wild type (MEF wt), knock-out per A β PP e APLPs (MEF1.1) e knock-out per presenilina 1 e 2 (MEF PS1-/- PS2-/-);
- HEK293 (*human embryonic kidney*) wild type (HEK wt) e stabili per A β PP, ossia sia trasfettate stabilmente con un vettore codificante per A β PP (HEK A β PP);
- A1 mes c-myc (*mouse embryonic mesencephalon*) (Chambery et al., 2009);
- amniociti di pazienti controllo e affetti da Trisomia 18 e 21 (Sindrome di Down).

Le cellule MEF, HEK293 e gli amniociti sono mantenuti in coltura a 37°C in atmosfera umidificata, con il 5% di CO₂ in terreno D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (EuroClone Paignton-Devon, UK), con l'aggiunta di siero bovino alla concentrazione del 10% (Gibco/Life Technologies Rockville, MA), L-glutamina 0,5 mM (EuroClone, Paignton-Devon, UK) ed antibiotici (penicillina 100 IU/ml e streptomicina 100 μ g/ml, EuroClone, Paignton-Devon, UK). La linea cellulare A1 mes c-myc, generata da mesencefalo embrionale di topo, é mantenuta in terreno MEM/F12 (Gibco/Life Technologies) supplementato con siero bovino (10%), L-glutamina e antibiotici (penicillina e streptomicina). Le cellule sono differenziate mediante privazione del siero dal terreno di crescita e l'aggiunta di cAMP (1mM) (Sigma, Saint Louis, MO, USA).

Tutte le linee cellulari riportate sono amplificate al raggiungimento della confluenza; tale processo viene eseguito lavando le cellule con PBS (8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Na₂HPO₄, 20 mg/l KH₂PO₄, PBS tablets, ICB Biomedicals), in modo tale da allontanare il terreno di coltura e le cellule morte in esso contenute, fonte di probabile contaminazione, e, in special modo, il siero, che inibisce l'azione dell'enzima tripsina (Trypsin-EDTA, Gibco). Quest'ultima viene, infatti, successivamente utilizzata per rompere i legami peptidici tra le cellule aderenti al substrato e quest'ultimo in modo tale da permettere il loro recupero e la successiva opportuna diluizione in nuove piastre.

2.2 Anticorpi

Per la rivelazione delle proteine di nostro interesse abbiamo utilizzato i seguenti anticorpi:

- l'anticorpo murino specifico per la proteina Tau (Tau 5) (Abcam, Cambridge, UK) diluito 1:100 per immunofluorescenza e per immunistoichimica e 1:800 in western blotting;
- l'anticorpo policlonale specifico per la tau totale murina e umana (BR134) (Goedert et al. 1989 a,b).
- l'anticorpo murino specifico per la proteina Tau quando è fosforilata a livello dei residui Thr 212 e Ser 214 (AT100) (Autogen Bioclear - Innogenetics, Wilshire, UK) diluito 1:100 per immunofluorescenza, 1:1000 per immunistoichimica e 1:500 in western blotting;
- l'anticorpo murino specifico per la proteina Tau quando è fosforilata nel residuo Thr181 (AT270) (Autogen Bioclear - Innogenetics, Wilshire, UK) diluito 1:100 per immunofluorescenza, 1:1000 in immunistoichimica, e per immunistoichimica e 1:500 in western blotting (Goedert et al., 1994);
- l'anticorpo murino specifico per la proteina Tau quando è fosforilata nel residuo Ser201 e Thr 205 (AT8) (Autogen Bioclear - Innogenetics, Wilshire, UK) diluito 1:100 per immunofluorescenza, 1:1000 per immunistoichimica e 1:800 in western blotting (Goedert et al., 1995);
- l'anticorpo murino specifico per la proteina Tau quando è fosforilata nel residuo Thr231 (AT180) (Autogen Bioclear - Innogenetics, Wilshire, UK) diluito 1:100 per

immunofluorescenza e per immunoistochimica e 1:800 in western blotting (Goedert et al., 1994);

- l'anticorpo murino specifico per la proteina Tau quando è fosforilata nel residuo Ser422 (p-Ser422) (Autogen Bioclear - Innogenetics, Wilshire, UK) diluito 1:100 per immunofluorescenza e per immunoistochimica e 1:3000 in western blotting;
- l'anticorpo specifico per ShcA (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) diluito 1:200 per l'immunoprecipitazione;
- l'anticorpo monoclonale murino specifico per Grb2 (Transduction Laboratories, Lexington, KY), diluito 1:5000 per l'immunorivelazione;
- l'anticorpo specifico per Grb2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluito 1:100 per l'immunofluorescenza e l'immunoistochimica
- gli anticorpi specifici per p44/42 ERK non fosforilato e per p44/42 ERK fosforilato (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), usati entrambe alla diluizione 1:1000 per l'immunorivelazione;
- l'anticorpo specifici per PP2A totale (subunita c) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, cod. 2038), usato alla diluizione 1:1000 per l'immunorivelazione;
- l'anticorpo specifici per α -PP2A fosforilata (Y307) (Abcam, Cambridge, UK, cod. ab32104), usato alla diluizione 1:5000 per l'immunorivelazione;
- l'anticorpo specifico per lc3 (CeNovus Biologicals, Littleton, USA) usato alla diluizione 1:750 per immunoistochimica e 1:1000 per l'immunorivelazione;
- Il monoclonale specifico per la fosforilazione in Ser9 dell'Istone H3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), usato 1:100 in immunofluorescenza;
- l'anticorpo specifico per l' α -tubulina (Abcam, Cambridge, UK) alla concentrazione di 1 μ g/mL sia per immunofluorescenza che per western blot;
- l'anticorpo specifico per GAPDH (Millipore, Billerica, MA), usato alla diluizione 1:5000 in western blot.
- anticorpi secondari Alexa 488, 568 e 350 (Molecular Probes, Eugene, OR) che emettono rispettivamente nel verde, nel rosso e nel blu diluiti 1:200 specifici o per topo o per coniglio;

2.3 Farmaci e droghe

Tutti i reagenti sono della Sigma (Saint Louis, MO) se non altrimenti specificato:

- DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]- S-phenylglycine t-butyl ester) inibitore completo di γ -secretasi;
- PD-98059, inibitore di MAPK kinasi;
- LY-294002, inibitore di PI3K;
- Leptomicina B, inibitore dell'esporto nucleare di proteine con sequenza NES;
- Selenato di sodio (Na_2SO_4). Il selenato di sodio è presente in natura in molti alimenti

come noci brasiliane, semi di senape e prodotti freschi. In quanto costituito dal selenio, un oligonutriente essenziale per l'uomo, noto per le sue proprietà biologiche benefiche, il selenato di sodio è oggetto di diversi studi sperimentali che mirano all'investigazione di una sua potenziale azione terapeutica in diverse condizioni patologiche, soprattutto quelle neurodegenerative (Rayman, 2000; Benton et al., 2002). Di maggiore notorietà è sicuramente il ruolo neuroprotettivo del selenio, il quale ha mostrato migliorare i deficit cognitivi in un modello murino di demenza e ridurre la fosforilazione di tau e l'attività γ -secretasica modulando quindi la produzione dei peptidi A β 1-40/1-42 in un modello murino overesprimente la selenioproteina M (Cardoso et al., 2010; Ishrat et al., 2009; Yim et al., 2009). Recentemente è stato tuttavia testato anche l'effetto protettivo del selenato di sodio in due modelli murini di tauopatia umana (transgenici per le forme umane di tau P301L e tau K369I) in cui tale composto ha mostrato ridurre la fosforilazione di tau e la formazione di aggregati neurofibrillari, migliorando anche la loro performance motoria e mnemonica e prevenendo la neurodegenerazione. Dati sperimentali hanno dimostrato che il meccanismo molecolare attraverso il quale agisce il selenato di sodio sia la stabilizzazione del complesso PP2A-tau. È noto che nei cervelli AD l'attività della fosfatasi PP2A è ridotta; in questo scenario, il selenato di sodio promuoverebbe l'attività di tale enzima favorendo la defosforilazione di tau (van et al., 2010; Corcoran et al., 2010).

2.4 Costrutti

Il costrutto A β PP -EGFP è stato ottenuto come segue: l'A β PP 695 umana clonata nel vettore pRc/CMV (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) è stata il template per la reazione di mutagenesi (QuickChange® mutagenesis kit, Stratagene, La Jolla, CA). Un set di primers, 5'-GAGCAGATGCAACCGGTCCCCGCCACAGC-3' senso e 5'-

GCTCAAGAACTTGGCGGTTGGATTTTCG-3' sono stati disegnati per aggiungere il sito di taglio per AgeI e rimuovere lo stop codon all'estremità 3' dell'AβPP. Il DNA mutato è stato digerito e legato attraverso i siti SacII ed AgeI del vettore pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA).

2.5 Trasfezione di DNA

a. Trasfezione con lipofectamina

Le cellule sono piastrate su vetrino in multi-well da 24 pozzetti ad una densità di 100.000 cellule/vetrino e sono state quindi trasfettate con lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) secondo il seguente protocollo: 2µg di DNA/vetrino e 1µl di Lipofectamina per ogni µg di DNA. Si preparano due differenti tubi eppendorf con ciascuna 50µl di Optimem (Gibco, Auckland, NZ); nella prima si mette il DNA nella quantità necessaria e nella seconda si mette la Lipofectamina in adeguato rapporto. Dopo un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente si unisce il contenuto delle due eppendorf e si incuba per 15 minuti a temperatura ambiente; trascorso tale tempo si trasferisce la miscela di trasfezione goccia a goccia nei vari pozzetti.

b. Trasfezione con Calcio fosfato

Le cellule sono piastrate su vetrino in multi-well da 24 pozzetti ad una densità di 100.000 cellule/vetrino e sono state quindi trasfettate con calcio fosfato secondo il seguente protocollo: si prepara la soluzione HBS 2x (Hepes 42mM, NaCl 275mM, KCl 10mM, NaH₂PO₄ 1,4mM, glucosio 10mM, pH=7,10) e la soluzione 0,25M di CaCl₂. Si mettono 2 µg di DNA in 40 µl di HBS 2x e dopo un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente si aggiungono 40 µl di CaCl₂ 0,25M. Dopo 15 minuti di incubazione si trasferisce la miscela di trasfezione goccia a goccia nei vari pozzetti.

2.6 Immunofluorescenza

Gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati svolti seguendo il seguente protocollo:

- 1 lavaggio da 2 minuti con PBS;
- fissazione delle cellule; sono stati usati due metodi diversi a seconda della proteina target investigata:
 - a. Metanolo freddo (-20°C) per 30 secondi per la colorazione di fosfo-tau;
 - b. Paraformaldeide (4%, PH 7.4) (4°C) per 15 minuti per la colorazione di tutte le altre proteine. Tale fissazione richiede la successiva incubazione delle cellule con la glicina (0,1 M, pH 2.1) che permette di mascherare tutti i legami aldeidici scoperti della paraformaldeide che ha immobilizzato il campione, evitando così che l'anticorpo che verrà aggiunto successivamente si leghi in modo aspecifico (con legami idrogeno, forza di Van der Waals) al campione.
- 3 lavaggi da 5 minuti con PBS;
- permeabilizzazione con Triton X-100 (0,1%) per 10 minuti (step eseguito a seconda della proteina target investigata)
- trattamento con anticorpo primario (1:100) in PBS con il 10% di NGS per 45 minuti;
- 3 lavaggi da 5 minuti con PBS;
- trattamento con anticorpi secondari (1:300) in PBS con il 10% di NGS per 45 minuti.
- 3 lavaggi da 5 minuti con PBS;

Dopo questa sequenza di passaggi i vetrini devono essere posizionati sui vetrini portaoggetto in modo da poterli osservare al microscopio: può essere utilizzato un normale microscopio a fluorescenza oppure un microscopio confocale. A tale scopo si lava il vetrino portaoggetto con etanolo e lo si lascia asciugare; si mette così una goccia di Mowiol sul vetrino portaoggetto e vi si appoggia il vetrino con le cellule capovolgendolo in modo da avere le cellule a contatto con il Mowiol. A questo punto si applica una leggera pressione sul vetrino per eliminare la maggior parte delle bolle d'aria presenti tra i due vetrini ed una volta asciugato il Mowiol si procede all'analisi al microscopio a fluorescenza.

2.7 Saggio MTT

Il test dell'MTT è un saggio di citotossicità colorimetrico che permette di testare la proliferazione e la vitalità cellulare ed in particolare l'efficienza mitocondriale. L'MTT

(bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) è un sale di tetrazolio che nel caso di cellule vitali viene ridotto dall'ambiente altamente riducente delle cellule proliferanti per azione della deidrogenasi mitocondriale. La riduzione dell'MTT determina la formazione di cristalli di formazano che attribuiscono la caratteristica colorazione violacea ai mitocondri delle cellule vitali. Al contrario in cellule non proliferanti o morte aventi quindi mitocondri non attivi, l'MTT non verrà ridotto con una conseguente colorazione violacea meno intensa. Questo saggio di citotossicità è stato utilizzato come analisi preliminare per misurare la proliferazione cellulare. Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla concentrazione di 1×10^4 cellule/pozzetto. Una volta adese alla superficie della piastra sono state private del siero per 48 ore prima di iniziare il saggio, ogni giorno. Il saggio prevede i seguenti passaggi:

- l'eliminazione del terreno di crescita e 3 lavaggi con PBS;
- l'aggiunta ad ogni pozzetto della soluzione di MTT in PBS alla concentrazione finale di 0,5 mg/mL e incubazione delle cellule per 2 ore a 37°C (il tempo d'incubazione non deve superare le 4 ore dato che l'MTT è citotossico);
- rimozione dell'MTT e aggiunta in ciascun pozzetto di 1ml di DMSO per sciogliere i cristalli di formazano formati;
- lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 570 nm (Victor II, Perkin–Elmer, 253 Milan, Italy). La vitalità cellulare è stata calcolata misurando la differenza in termini densità ottica tra i campioni trattati rispetto ai controlli.

2.8 Saggio BrdU

Il saggio della BrdU sfrutta la proprietà di questo composto sintetico di essere un analogo sintetico della timina, per cui viene incorporato nel DNA delle cellule proliferanti, rappresentando un buon indicatore delle cellule che sono in fase mitotica del ciclo cellulare. Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla concentrazione di 1×10^4 cellule/pozzetto. Una volta adese alla superficie della piastra, sono state private del siero per 48 ore prima di iniziare il saggio, ogni giorno. Il saggio prevede l'incubazione delle cellule con la BrdU per 4 ore; successivamente le cellule sono lisate e marcate con un anticorpo specifico per la BrdU (kit Roche). Quindi si è proceduto con la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 570 nm (Victor II, Perkin–Elmer, 253 Milan, Italy). La duplicazione cellulare è stata calcolata misurando la differenza in termini densità

ottica tra i campioni trattati rispetto ai controlli.

2.9 Western blot

2.9.1 Estrazione delle proteine

a. Estrazione delle proteine totali

Le cellule sono lisate in ghiaccio, con un buffer contenente NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH=7,6 EDTA 10 mM, NP40 0,5%, acido colico 0,5%. Dopo un'incubazione di 10 minuti, il lisato viene centrifugato a 200 g per 10 minuti a 4°C.

Per la preparazione degli estratti proteici da sottoporre ad SDS-PAGE, le cellule sono state raccolte in PBS freddo, risospese in RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH=7.2, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 0,5% acido deossicolico, 0,1% SDS) in presenza di una miscela di inibitori di proteasi (complete EDTA free e 1mM PMSF – Roche Applied Science) e gli inibitori di fosfatasi (10mM NaF e 1mM Na₃VO₄) e tenute in ghiaccio per circa 30 minuti. Successivamente gli estratti sono stati centrifugati a 14000 rpm per 10' (4°C) per eliminare i detriti cellulari e le membrane. Il surnatante è stato invece recuperato e sottoposto alla conta della concentrazione proteica mediante metodo di Bradford.

b. Separazione membrane e nuclei (Kit quiagen)

Per la separazione delle proteine citoplasmatiche da quelle nucleari è usato il Q-proteome Cell Compartment kit della quiagen (Cat. 37502).

c. Separazione delle frazioni proteiche solubili e insolubili

Il principio di separazione della frazione proteica solubile da quella insolubile sfrutta due proprietà della proteina tau: la sua solubilità in acido perclorico 2.5%, alta concentrazione di sali (0.8 N NaCl) e sucrosio e la sua insolubilità in detergenti quali l'N-

Lauroylsarcosine, comunemente noto come *Sarcosyl*. Tale tecnica di estrazione delle proteine è stata usata principalmente per i tessuti cerebrali murini.

Tessuti di cervello (conservati a -80°C) sono stati pesati e omogenizzati in un buffer di estrazione freddo (25mM Tris-HCL pH7.4 1M, 150mM NaCl 1M, 1mM EDTA, 100 mM, 1mM EGTA, 100 mM, 5mM NaPyrophosphate, 100 mM, 10mM B glycerophosphate, 100 mM, 30mM NaFluoride 500mM, 10mM NaVanadate100 Mm, completo di inibitori di proteasi). Gli omogenati sono stati centrifugati per 15 minuti a 80000 rpm (4°C) ed il surnatante, costituente la frazione solubile proteica, è stato recuperato e conservato a - 20°C per la successiva analisi biochimica. Il pellet è stato risospeso in un secondo buffer di estrazione (0.8M NaCl 1M, 10% Sucrose, 10mM Tris-HCl pH7.4 1M, 1mM EGTA100mM, inibitori di proteasi), lasciato in ghiaccio per circa 20 minuti e centrifugato per 20 minuti a 6000 rpm. Al surnatante è stato aggiunto il buffer 1% sakosyl (Sigma, L9150) ed è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente in lieve agitazione. Dopo aver centrifugato per un 1 ora a 80000 rpm, il pellet è stato risospeso in 50 mM Tris-Hcl pH 7.4 (300 mg/g tessuto).

2.9.2 Conta della concentrazione proteica (Saggio di Bradford)

Aliquote opportune delle miscele proteiche da analizzare sono state diluite ad 800 µl con acqua, dopodiché ai campioni è stato aggiunto 200 µl di reagente Bradford, e le rispettive letture spettrofotometriche sono state determinate alla lunghezza d'onda di 595 nm. Per risalire alla concentrazione delle proteine ci si è serviti di una retta di taratura costruita sulla base dei valori di assorbanza ottenuti con quantità note di albumina di siero bovino (BSA).

2.9.3 Preparazione dei campioni

A seconda delle proteine target da analizzare, sono state utilizzate concentrazioni proteiche diverse da risolvere su del di SDS-poliacrilamide. L'estratto proteico da analizzare mediante western blot è stato risospeso in sample buffer (SDS 8%, 24% glicerolo, 100 mM Tris, 100 mM Tricina, 15 mg Ditiotreitolo, 0,05% blue di Comassie). I campioni e il marcatore di peso molecolare (Biorad) sono stati denaturati a 99°C per 5' prima di essere caricati su gel.

2.9.4 Elettroforesi e trasferimento

La preparazione del gel viene effettuata con una percentuale di acrilamide standard per lo stacking gel (4%) e variabile per il separating gel a seconda del peso molecolare delle proteine da investigare (10% per tau, ERK1,2, AKT, PP2A; 12 % per A β ; 14% per LC3 I-II).

Il gel è composto da gel buffer (Tris 1 M, SDS 0,1%, pH=8,45), acrilamide, glicerolo (solo nel separating gel), acqua bidistillata (q.b. per portare a volume), TEMED e ammonio persolfato. Una volta polimerizzata l'acrilamide, si caricano i campioni da analizzare ad una concentrazione proteica variabile in base alla proteina target e al modello sperimentale da cui questa è stata estratta; per il caricamento della frazione insolubile, poiché il pellet proteico viene risospeso in un volume di buffer proporzionale al peso di tessuto originario si carica un volume di campione standard. L'elettroforesi viene effettuata usando un buffer di corsa costituito da 0.025 M Tris, 0.192 M, Glicina pH8.3, 0.1% SDS, pH=8.25 con l'apparato Biorad Mini Protean Tetra Cell. La corsa dei campioni proteici viene svolta a 100V costanti per circa 2 ore, dopo la quale viene svolto il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di PVDF (polivinil difluoruro). La membrana viene equilibrata prima con metanolo e poi con transfer buffer (192 M glicina, 0.025 M Tris, 20% metanolo). Il gel viene posto a contatto con la membrana e si mettono due strati di carta: uno a contatto con il gel, l'altro con la membrana. In questo modo si ottiene il "sandwich" che sarà messo nell'apparato di trasferimento (BioRad Trans-Blot Cell). Il transfer è svolto a 85V costanti per 2 ore a 4°C in transfer buffer. Dopo il trasferimento, la membrana che ha impresse sulla sue superficie le proteine trasferite dal gel, viene incubata con il blocking buffer BSA (bovine serum albumine)/milk 5% in TBS (4,85g di TRIS, 24g di NaCl, acqua a 4 litri, pH=7,50)-Tween (0,5 ml di Tween 20X a litro di TBS) per almeno 1 ora: questo serve per coprire i siti aspecifici della membrana. Quindi si procede all'incubazione over night a 4°C con l'anticorpo primario scelto, opportunamente diluito in TBS-Tween addizionato dell'1% di NGS (normal goat serum). Il giorno seguente si fanno 7 lavaggi da 5 minuti in TBS-Tween e si incuba la membrana con l'anticorpo secondario marcato con Horse Radish Peroxidase, diluito 1:4000, in TBS-Tween per un'ora a temperatura ambiente. Successivamente si fanno altri 7 lavaggi da 5 minuti in TBS-Tween, si fa sgocciolare la membrana per eliminare l'eccesso di TBS-Tween, si espone all'ECL (enhanced chemiluminescence system, GE Health Care) per 5 minuti, si fa colare il liquido in eccesso e si mette tra due superfici trasparenti. L'ECL reagisce con le perossidasi emettendo ad una lunghezza d'onda di 428 nm che è in grado di impressionare le lastre da RX (GE Health Care). Le bande delle proteine vengono così identificate sul supporto RX dall'anticorpo

specifico utilizzato. In camera oscura si espone alle lastre fotografiche per tempi diversi, a seconda del grado di intensità delle bande.

Lo studio densitometrico delle bande analizzate in western è stato effettuato con uno strumento gel-doc (Bio-Rad).

2.10 Animali e trattamento

Per lo studio della modulazione del selenato di sodio è stato utilizzato un modello murino di tautopatìa umana transgenico per l'isoforma umana di tau 4R0N (383 aa) portatrice della mutazione P301S, associata alla demenza frontotemporale con Parkinsonismo legata al cromosoma 17 (FTDP-17) (background C57BL/6J). In condizione di omozigosi, tali topi sviluppano a 5-6 mesi di età un fenotipo neuropatologico caratterizzato da generale debolezza muscolare, tremore e severa parapesia (Allen et al., 2002; Bugiani et al., 1999; Scattoni et al., 2010).

Lo studio è stato condotto su 30 topi divisi in 2 gruppi di trattamento (n=6 topi per gruppo): acqua (gruppo controllo) e selenato di sodio (12 ug/mL). Il trattamento, iniziato dopo lo svezzamento dei topi (a circa un mese di vita), è durato 20 settimane durante le quali le soluzioni sono state cambiate regolarmente 2 volte a settimana. Al termine del trattamento, quando tale modello murino mostra il fenotipo neuropatologico descritto precedentemente (5 mesi di vita), i topi sono stati sacrificati e ne è stata effettuata la dissezione del cervello.

Il tessuto così prelevato è stato analizzato mediante le tecniche del western blot e di immunoistochimica. Nello specifico la tecnica del western blot ha previsto una preparazione dei campioni basata sulla separazione della frazione proteica solubile da quella insolubile (Paragrafo 2.5.1.c) La tecnica immunoistochimica è stata eseguita secondo il protocollo di seguito riportato.

2.11 Immunoistochimica

2.11.1 Immunoistochimica su fettine di cervello “free floating”

Tessuti cerebrali sono stati sezionati in fettine spesse 30 μm con l'utilizzo di un microtomo. Le fettine cerebrali sono state raccolte, separatamente, in pozzetti di una multiwell da 96 e conservate in PBS a 4°C. Per la colorazione le fettine sono state processate nel seguente modo:

- permeabilizzazione per 5 minuti con PBS + 0.5% Triton X-100 (freddo);
- 3 lavaggi da 10 minuti con PBS + 0,1% di Triton X-100;
- 2 ore di blocking a temperatura ambiente con PBS-Triton X-100 (0,1%) + 3% BSA (albumina sierica bovina);
- incubazione con l'anticorpo primario diluito nella soluzione di blocking ON a 4°C;
- 3 lavaggi da 10 minuti con PBS + 0,1% di Triton X-100;
- incubazione con l'anticorpo secondario (con DAPI, diluizione 1:1000) diluito nella soluzione di blocking per 2 ore a temperatura ambiente;
- 3 lavaggi da 10 minuti con PBS + 0,1% di Triton X-100;
- montaggio delle fettine con il Vectashield mounting medium (Vector Laboratories).

2.11.2 Immunoistochimica su fettine di cervello incluse in paraffina

a. Deparaffinazione e Reidratazione

I campioni di cervello utilizzati si presentano come fettine sottili fissate con paraffina su vetrini porta-oggetto. Per poter procedere con la tecnica di immunofluorescenza è necessario rimuovere la paraffina che altrimenti impedirebbe il riconoscimento degli epitopi da parte degli anticorpi.

- 2 lavaggi da 5 minuti in Xilene;
- 1 lavaggio da 5 minuti in Etanolo 100 %;
- 1 lavaggio da 5 minuti in Etanolo 80%;
- 2 lavaggi da 5 minuti in acqua bidistillata.

b. Esposizione degli antigeni

- Bollire 8 minuti in microonde in una soluzione di Sodio Citrato 10mM (pH=6);
- incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente in una soluzione di Sodio Citrato 10mM (pH=6);
- 2 lavaggi da 5 minuti in TBS.

c. Immunostaining

- Blocking di 60 minuti in normal goat serum 1:4 in TBS a temperatura ambiente in camera umida;

- incubazione over night con gli anticorpi primari specifici opportunamente diluiti in buffer Dako (Dako Cytomation, Glostrup, DK);
- 2 lavaggi da 5 minuti in TBS;
- incubazione a temperatura ambiente per 60 minuti con gli anticorpi secondari Alexa diluiti 1:100;
- 2 lavaggi da 5 minuti in TBS;
- Colorazione con DAPI 1:200 per 3 minuti;
- 2 lavaggi da 5 minuti in TBS;

d. Riduzione dell'autofluorescenza

- Incubazione di 10 minuti con Sudan Black B (soluzione 0,3% in 70% EtOH) (Fluka Buchs, CH);
- 3 lavaggi da 5 minuti in TBS;
- montaggio dei vetrini con Mowiol.

Capitolo 3

RISULTATI

3.1 Localizzazione intracellulare di fosfo-tau in fibroblasti embrionali di topo e sua regolazione mediata da A β PP

Tau è una fosfoproteina localizzata sia a livello del citoscheletro sia a livello nucleare; al fine di valutare la modulazione della sua fosforilazione nei diversi compartimenti cellulari in dipendenza da A β PP, abbiamo svolto esperimenti di immunofluorescenza in fibroblasti embrionali di topo (MEF). Di tale linea cellulare, ci siamo avvalsi, oltre del clone wild-type (wt), anche del clone MEF A β PP $-/-$ (KO A β PP), in cui i geni per A β PP e A β PLPs sono deleti, e del clone MEF PS $-/-$ (KO PS), in cui l'attività γ -secretasica è assente per ablazione dei geni PS1 e PS2. Le MEF KO A β PP sono utili per verificare il fenotipo in assenza di A β PP, mentre le KO PS mostrano un fenotipo caratterizzato da un aumento endogeno di CTFs (per blocco del taglio γ -secretasico) e la concomitante assenza di generazione di A β o AICDs. La fosforilazione di tau generalmente osservata nelle MEF è comunque nucleare, ed è rappresentata da un segnale puntinato localizzato nelle

cosiddette “nuclear puncta” o “nuclear speckles”; lieve, o quasi nullo, è il segnale citoscheletrico. Queste osservazioni sono in linea con quelle riscontrate in altre linee cellulari studiate nel nostro laboratorio (HEK 293, SH-SY5Y, SKNBE, H4, fibroblasti umani) e da altri gruppi di ricerca (Rossi et al., 2008). Abbiamo quindi condotto l’analisi investigando la fosforilazione di diversi fosfo-epitopi di tau riconosciuti dagli anticorpi AT270 (p-Thr181), AT100 (p-Thr212/p-Ser214) e AT8 (p-Ser202-Thr205) nelle cellule MEF. In una prima serie di esperimenti abbiamo osservato come generalmente le cellule KO A β PP mostrino un segnale di tau inferiore e meno pronunciato, sempre a livello nucleare, rispetto alle cellule MEF wild type. Successivamente, per meglio investigare il contributo di A β PP nella fosforilazione di tau, abbiamo trasfettato le MEF KO A β PP con un vettore codificante una proteina di fusione tra A β PP695 e GFP (Green Fluorescent Protein) in modo da poter confrontare cellule prive di A β PP e cellule che invece esprimono nuovamente A β PP nello stesso vetrino. Per questo scopo abbiamo eseguito la marcatura con l’anticorpo AT270 coniugato Alexa 568 e con il DAPI per colorare i nuclei (Fig. 1A). In parallelo abbiamo investigato la fosforilazione di un altro fosfo-epitopo riconosciuto dall’anticorpo AT100. In questo caso MEF KO A β PP sono state transfettate con A β PP in fusione con una GFP rossa (A β PP-Red), sono poi state marcate con l’anticorpo AT100 coniugato Alexa 488 e con il DAPI per la colorazione nucleare (Fig. 1B). In entrambi gli esperimenti, abbiamo osservato solo nelle cellule overesprimenti A β PP una sensibile riduzione e quasi lo spegnimento del segnale nucleare di fosfo-tau a favore di una sua accensione a livello citoscheletrico, in maniera molto localizzata. L’analisi quantitativa, eseguita su molteplici prove sperimentali effettuate, conferma chiaramente la riduzione del segnale nucleare di tau nelle cellule overesprimenti A β PP-695 (-82.7%) (Grafico, fig. 1).

Fenotipo diverso è stato osservato colorando sempre le cellule MEF KO A β PP transfettate con A β PP-GFP con l’anticorpo AT8. Il fosfo-epitopo riconosciuto da tale anticorpo (Ser202-Thr205) non ha mostrato, infatti, seguire la stessa modulazione di fosforilazione da parte di A β PP, per cui, anche in condizioni di overespressione di quest’ultima, ha conservato il suo segnale nucleare, tra l’altro particolarmente più intenso e circoscritto di quello dato dagli anticorpi AT100 e AT270 (Fig 1C). Possiamo così concludere che la fosforilazione nucleare di tau è modificata da A β PP a livello di specifici fosfo-epitopi e che tale modulazione si contraddistingue da una riduzione del segnale di

fosfo-tau a livello nucleare ed una sua accensione a livello citoscheletrico quando A β PP è overespressa.

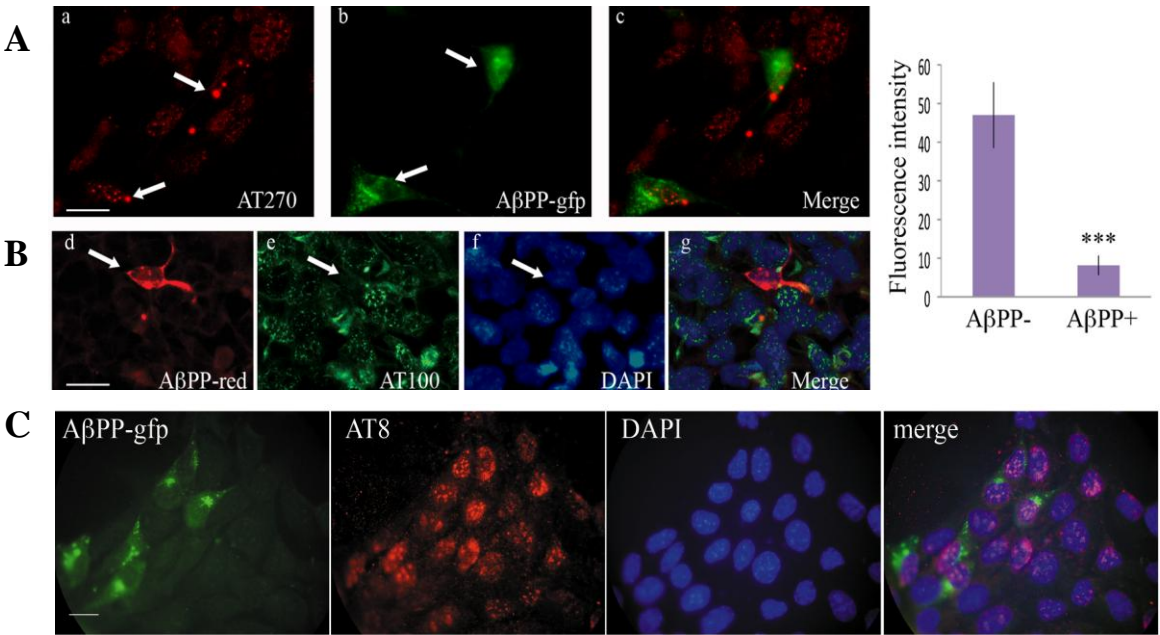


Fig. 1 - Localizzazione di fosfo-tau in cellule MEF KO A β PP. **A)** MEF KO A β PP trasfettate con A β PP696-GFP sono marcate con l'anticorpo AT270 (p-Thr181) coniugato Alexa 568; cellule overesprimenti A β PP695 mostrano uno spegnimento del segnale nucleare a favore di un segnale extranucleare puntinato. **B)** MEF KO A β PP trasfettate con A β PP696-Red sono marcate con l'anticorpo AT100 (p-Thr212/p-Ser214) coniugato Alexa 488; cellule overesprimenti A β PP695 mostrano una riduzione del segnale nucleare ed un'accensione del segnale citosolico. La rappresentazione grafica in alto a destra dell'intensità della fluorescenza è stata ottenuta da esperimenti eseguiti in triplicato, misurando lo stesso numero di cellule A β PP -/- o esprimenti A β PP-GFP in 12-15 campi diversi (ingrandimento 63X, software Laserpix; ***p < 0.001). **C)** MEF KO A β PP trasfettate con A β PP696-GFP sono marcate con l'anticorpo AT8 coniugato Alexa 568; tutte le cellule, indipendentemente dall'overespressione di A β PP mostrano un segnale di fosfo-tau intenso e circoscritto al compartimento nucleare.

3.2 Localizzazione intracellulare di fosfo-tau in un modello cellulare di trisomia 21

Al fine di confermare quanto osservato nei fibroblasti embrionali di topo, abbiamo investigato la fosforilazione di tau in condizione di overespressione para-fisiologica di A β PP. A tale scopo abbiamo eseguito esperimenti di immunofluorescenza su amniociti ottenuti da soggetti con Trisomia 21, in cui la presenza di tre copie del cromosoma 21 determina una overespressione di A β PP ed un fenotipo simile all'AD in età adulta. Entrambe le colorazioni con gli anticorpi AT100 e AT270 hanno confermato quanto osservato nella linea cellulare MEF. Amniociti controllo, Trisomia 21 e Trisomia 18 (rappresentanti un ulteriore controllo, in quanto pur avendo una trisomia non overesprimono A β PP) sono stati colorati per entrambi i fosfo-epitopi riconosciuti dagli anticorpi AT100 ed AT270 (Fig. 2-3). La colorazione con l'anticorpo AT100 ha mostrato un segnale nucleare ben circoscritto in entrambi gli amniociti controllo; fenotipo revertito a favore di un segnale citoscheletrico puntinato ben definito negli amniociti Down (Fig. 2). Stessa modulazione è stata osservata colorando gli amniociti con l'anticorpo AT270 (Fig. 3). Possiamo quindi dire che A β PP, in condizioni di overespressione, determina una inversione dei rapporti di equilibrio tra il pool citoscheletrico e quello nucleare di tau. In particolare, A β PP diminuisce la fosforilazione di tau nucleare per alcuni epitopi, aumentandone invece l'accensione a livello citoscheletrico.

3.3 Localizzazione di fosfo-tau in tessuti autoptici cerebrali controllo e AD

Al fine di investigare la localizzazione intracellulare di fosfo-tau anche in tessuti autoptici cerebrali provenienti sia da pazienti non dementi sia da soggetti affetti da AD, abbiamo condotto esperimenti di immunoistochimica su fettine tissutali cerebrali della regione corticale temporale e frontale. In fettine cerebrali ottenute da soggetti non-AD la colorazione con l'anticorpo AT100 coniugato Alexa 488 identifica una localizzazione neuronale di fosfo-tau prettamente nucleare e nessuna evidenza di aggregati neurofibrillari (NTFs) o di un segnale citosolico/citoscheletrico; nessuna evidenza di fosfo-tau a livello degli astrociti (segnalati con un asterisco) (Fig. 4A). Fenotipo diverso è mostrato dai tessuti cerebrali AD, che mostrano una fosforilazione di tau completamente extra-nucleare, contraddistinta da aggregati neurofibrillari, *neuropil threads* e, soprattutto, da assenza del pool nucleare di tau (Fig. 4B).

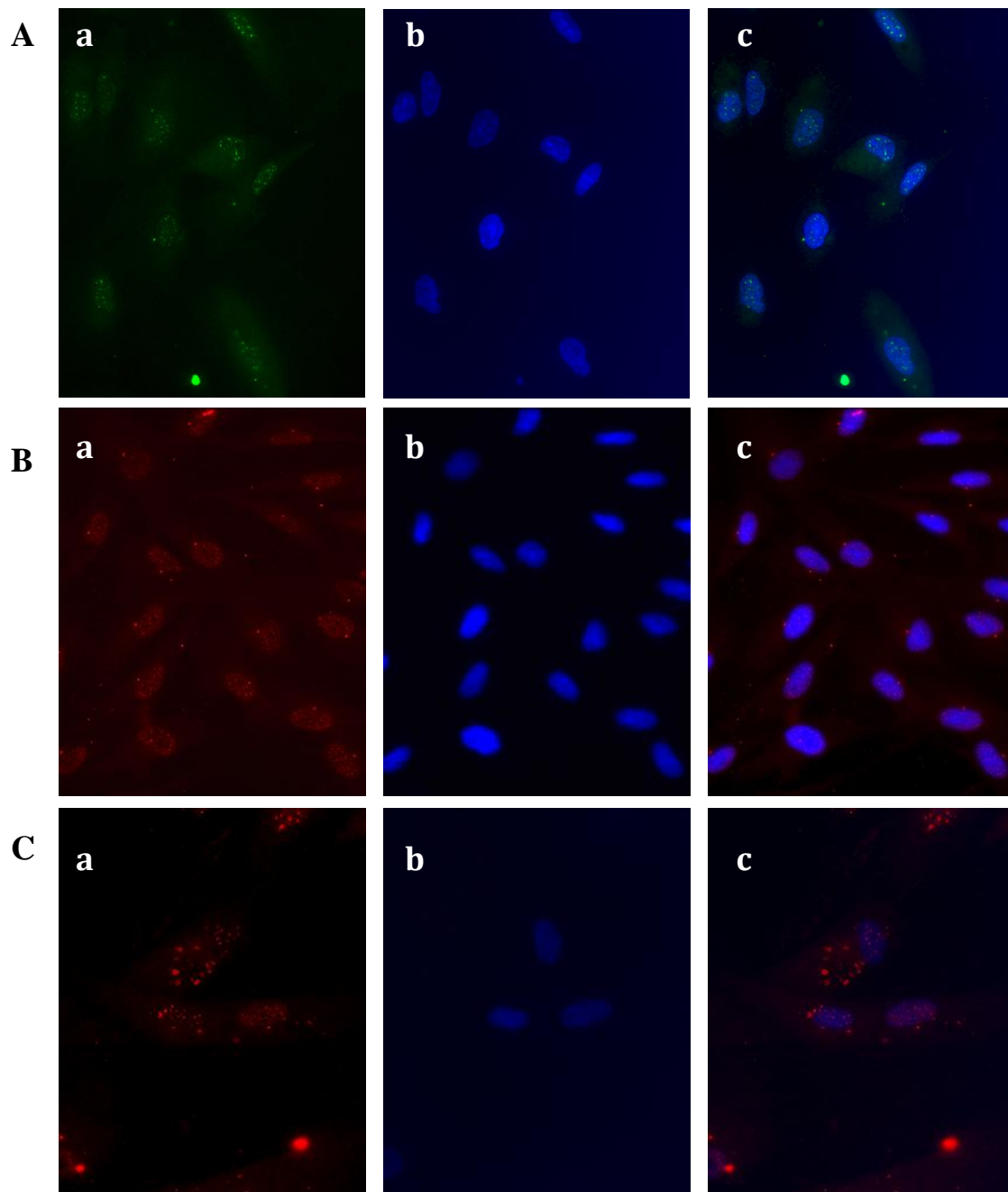


Fig. 2 – Localizzazione di fosfo-tau (AT100; p-Thr212/p-Ser214) in amniociti di pazienti controllo, con Trisomia 18, e affetti da Trisomia 21. **A)** Amniociti provenienti da soggetti normali marcati con l’anticorpo AT100 coniugato Alexa 488 (pannello a) e il DAPI (pannello b) mostrano un segnale di fosfo-tau ben definito a livello nucleare. **B)** Amniociti provenienti da pazienti affetti da Trisomia 18, considerati come controllo, marcati con l’anticorpo AT100 coniugato Alexa 568 (pannello a) e il DAPI (pannello b) mostrano un segnale di fosfo-tau ben definito a livello nucleare. **C)** Amniociti provenienti da pazienti affetti da trisomia 21 marcati con l’anticorpo AT100 (pannello a) coniugato Alexa 568 e il DAPI (pannello b) mostrano una riduzione del segnale nucleare di fosfo-tau ed una corrispondente accensione del segnale extra-nucleare.

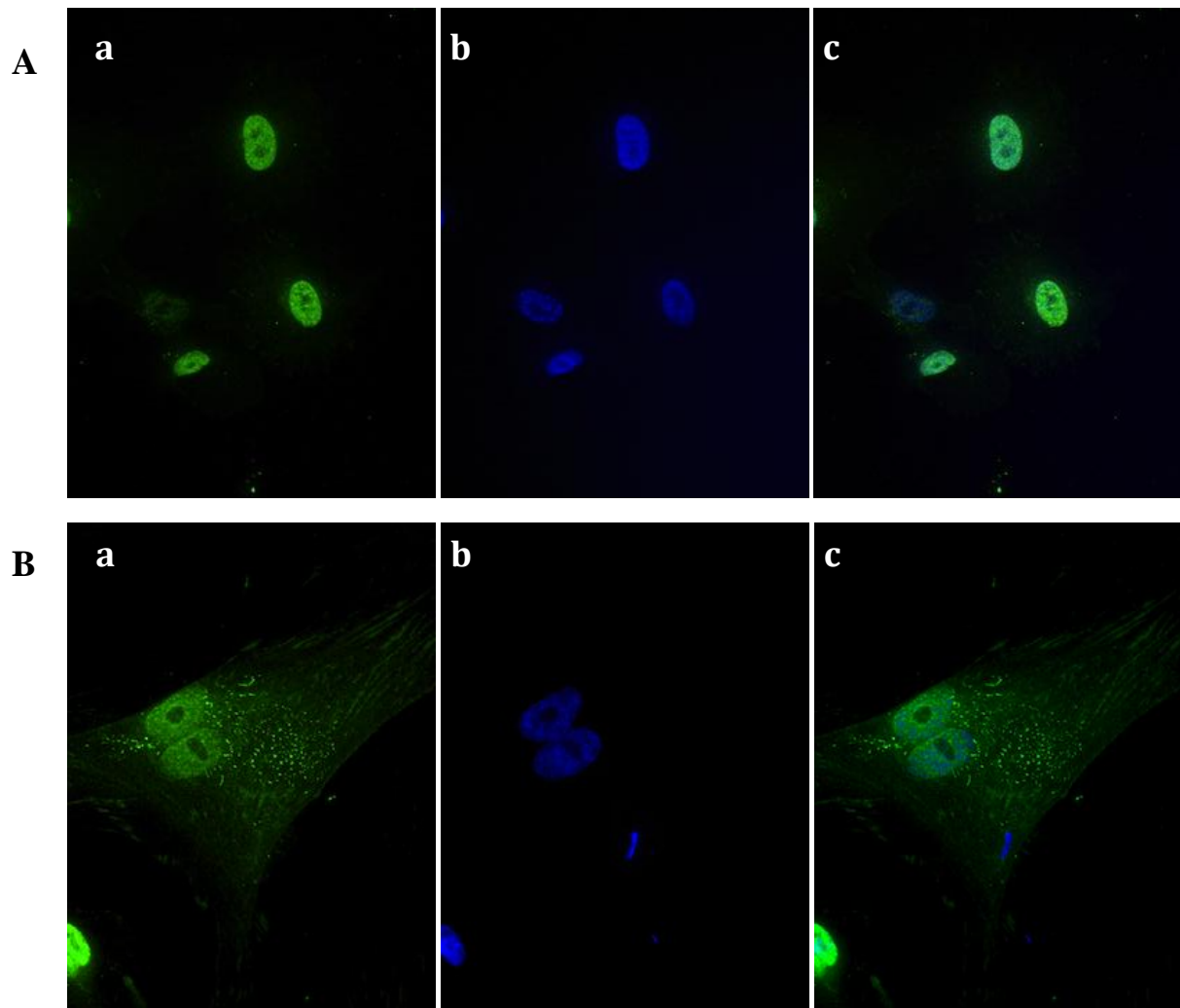
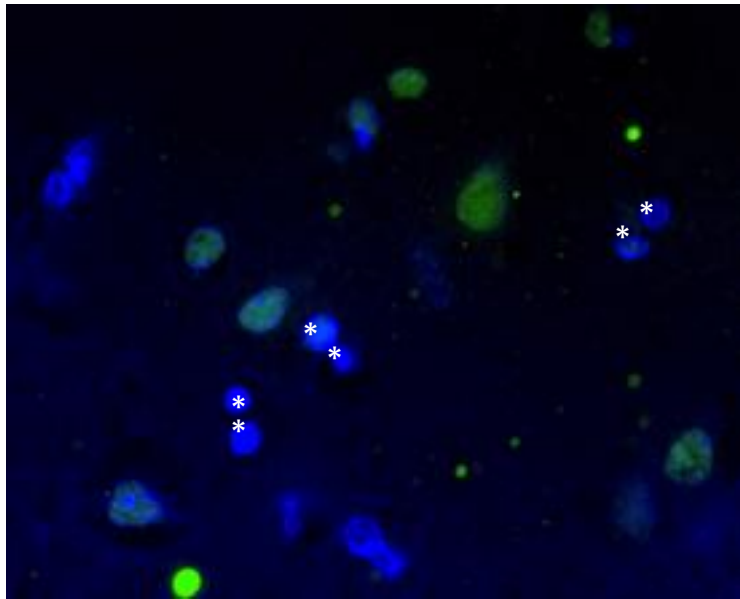


Fig. 3 – Localizzazione di fosfo-tau (AT270; p-Thr181) in amniociti controllo e affetti da Trisomia 21. **A)** Amniociti provenienti da soggetti sani marcati con l’anticorpo AT270 coniugato Alexa 488 (pannello a) e il DAPI (pannello b) mostrano un segnale di fosfo-tau ben definito a livello nucleare. **B)** Amniociti provenienti da pazienti affetti da trisomia 21 marcati con l’anticorpo AT270 (pannello a) coniugato Alexa 488 e il DAPI (pannello b) mostrano una riduzione del segnale nucleare di fosfo-tau ed una corrispondente accensione del segnale extra-nucleare.

A. CTR



B. AD

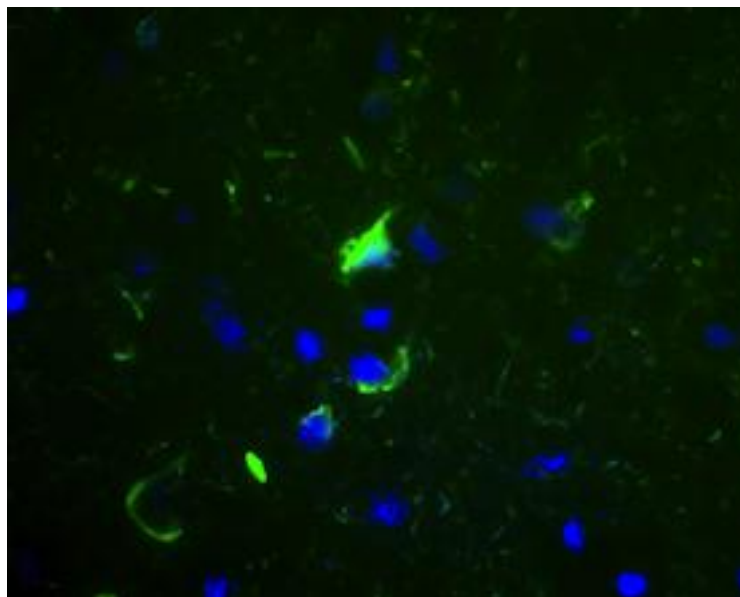


Fig. 4 – Localizzazione di fosfo-tau (AT100; p-Thr212/p-Ser214) in tessuti cerebrali controllo e AD. **A)** Fettina di tessuto cerebrale controllo marcata con l'anticorpo AT100 Alexa-488 ed il DAPI mostra un segnale di fosfo-tau nucleare presente, tra l'altro, solo nei neuroni e non negli astrociti (segnalati con un asterisco). **B)** Fettina di tessuto cerebrale AD marcata con l'anticorpo AT100 Alexa-488 e il DAPI mostra un segnale di fosfo-tau extranucleare; numerosi sono i neuroni con aggregati neurofibrillari.

3.4 Modulazione di fosfo-tau in funzione del processing di A β PP

Ci siamo quindi chiesti se l'effetto di A β PP su tau fosse dovuto al suo processing. A tale scopo ci siamo avvalsi del clone KO PS della linea cellulare MEF in cui l'attività γ -secretasica è assente a causa della deplezione di Presenilina 1/2.

In linea con quanto svolto per le MEF KO A β PP, abbiamo eseguito esperimenti di immunofluorescenza in cui abbiamo transfettato le MEF KO PS con la proteina di fusione A β PP-GFP e le abbiamo marcate con l'anticorpo AT270 coniugato Alexa 568 e con il DAPI per la colorazione nucleare. Benchè in molte cellule MEF KO PS sia presente un segnale nucleare di fosfo-tau molto più forte rispetto a quello rilevato nelle MEF wt e KO A β PP, in molte cellule è presente una spontanea accensione del segnale citoscheletrico/citosolico di fosfo-tau, accompagnato dal quasi completo spegnimento del segnale nucleare. Questo fenotipo si è rilevato particolarmente più accentuato nelle cellule overesprimenti A β PP-GFP (Fig. 5A).

Per confermare quanto osservato in immunofluorescenza, abbiamo eseguito esperimenti di western blot sulle frazioni cellulari, citoscheletrica e nucleare, di cellule MEF wt e KO PS. L'analisi del fosfo-epitopo AT270 e della quota totale di tau rilevata con l'anticorpo Tau5 ha mostrato che nelle MEF wt circa il 100% di Tau (Tau 5) è nucleare e fosforilato a livello del fosfo-epitopo Thr181 (AT270); la rispettiva quota citoscheletrica è per lo più irrilevabile. Al contrario, le MEF KO PS hanno mostrato un aumento della quota di tau a livello citoscheletrico che è risultata anche fosforilata (Fig. 5B). Tale dato ci dice che la fosforilazione di tau, nonché l'accensione della sua quota citoscheletrica, può essere modulata da A β PP. Più precisamente, i dati ottenuti nelle cellule KO PS indicano che la differente fosforilazione di tau nei compartimenti nucleare/citoscheletrico, potrebbe essere dato o dall'accumulo dei frammenti C-terminali (CTFs) di A β PP a livello di membrana o dall'assenza di frammenti AICDs a livello nucleare.

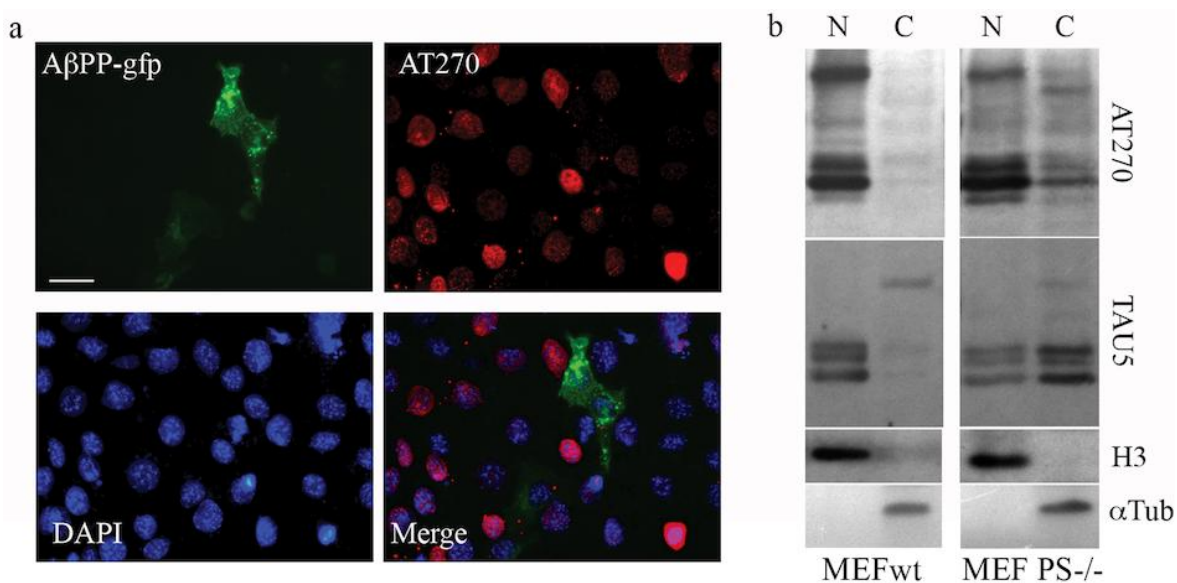


Fig. 5 – Localizzazione di fosfo-tau in funzione di AβPP e Presenilina in MEF KO PS. **A)** MEF KO PS trasfettate con AβPP696-GFP e marcate con l’anticorpo AT270 (p-Thr231) coniugato Alexa 568, mostrano un segnale nucleare di fosfo-tau particolarmente acceso che si spegne in condizione di overespressione di AβPP ed una spontanea accensione del segnale citoscheletrico/citosolico. **B)** Analisi mediante western blot delle frazioni proteiche nucleari e citoscheletriche di cellule MEF wt e KO PS usando l’anticorpo AT270 (p-Thr181) e Tau5 (tau totale). Il fosfo-istone H3 e la tubulina (α-tub) sono mostrati come controllo della purificazione delle due frazioni cellulari. Il blot conferma quanto osservato nell’IF.

3.5 *Meccanismo molecolare di accensione/spegnimento di fosfo-tau nei compartimenti citoplasma/citoscheletro e nucleare.*

3.5.1 *Compartimentalizzazione di tau*

Il differente rapporto tra quota nucleare e citoscheletrica di tau potrebbe essere dovuta sia ad un alterato rapporto tra chinasi e fosfatasi o ad una traslocazione di tau. Tenuto conto che almeno per le isoforme Tau D, E ed F è presente una sequenza NES-like (segnale di esporto nucleare) abbiamo trattato le cellule MEF wt con la leptomicina B, un farmaco inibitore del trasporto nucleo-citoplasma di proteine dotate della sequenza segnale NES. Le cellule, private del siero per 24 ore, sono state trattate con tale farmaco (10 ng/mL) per 5 ore e successivamente sono state lisate utilizzando un kit di purificazione che ci ha permesso di separare il pool nucleare da quello citoscheletrico. Mediante la tecnica

del western blot abbiamo investigato la fosforilazione di tau a livello del fosfo-epitopo AT100, il cui segnale è stato comparato con quello dato dall'anticorpo Tau5 specifico per la quota totale di tau, fosforilata e non fosforilata (Fig. 6A).

In questi esperimenti abbiamo osservato che nelle MEF wt la quota nucleare di tau è ampiamente fosforilata, e che quella citoscheletrica è minore ma ugualmente fosforilata (almeno nell'epitopo riconosciuto da AT100). Dopo il trattamento con la leptomicina B, si osserva una riduzione di fosfo-tau a livello nucleare e la scomparsa della quota associata al citoscheletro evidenziata sia da Tau5 (tau totale), sia da AT100 (tau fosforilata), indicando che probabilmente lo *switch on-off* di fosfo-tau tra il nucleo ed il citoplasma può essere dovuto anche ad un trasloco della stessa tau tra i due compartimenti cellulari. Eseguendo un esperimento comparativo di immunofluorescenza in cui le cellule MEF wt sono state sottoposte al medesimo trattamento dell'esperimento precedente, abbiamo osservato un fenotipo ancora più marcato di spegnimento del segnale nucleare di fosfo-tau in condizioni di blocco del trasporto proteico nucleo-citoplasma (Fig. 6B). In tale esperimento di immunofluorescenza, tuttavia, manca il controllo della tau totale (gli anticorpi per tau totale a nostra disposizione non danno infatti segnali affidabili in IF) che ci avrebbe potuto dare la totale conferma dell'ipotesi della traslocazione di tau tra i due compartimenti cellulari.

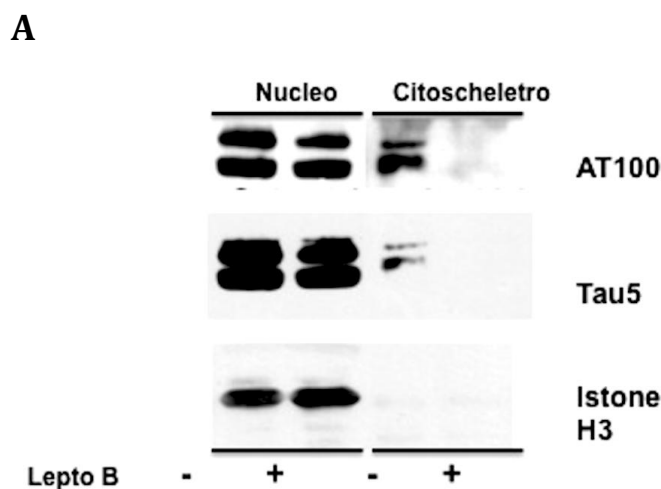
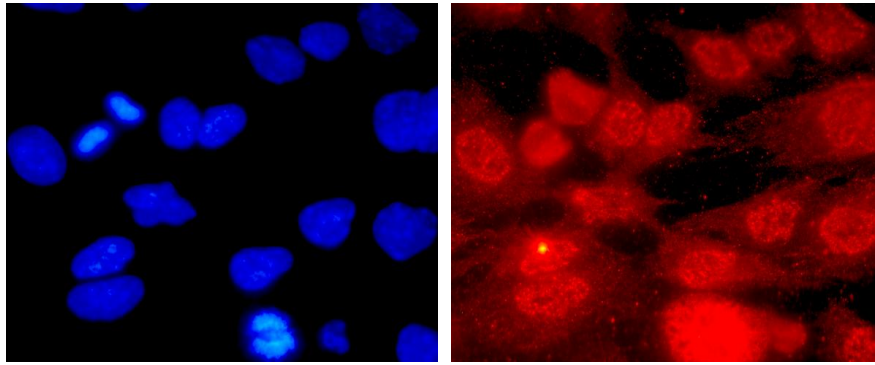


Fig. 6A – Western blot sulle frazioni cellulari (citoscheletrica e nucleare) di cellule MEF wild type trattate con la Leptomicina B (inibitore dell'esporto nucleo-citoplasma). È analizzata la fosforilazione di tau a livello del fosfo-epitopo AT100 (p-Thr212/p-Ser214) comparata con la sua quota totale riconosciuta dall'anticorpo Tau5. Il blocco dell'esporto nucleare determina una riduzione di fosfo-tau a livello nucleare e la scomparsa della quota associata al citoscheletro sia evidenziata da Tau5 (tau totale) sia da AT100 (tau fosforilata).

CTR



LEPTO B

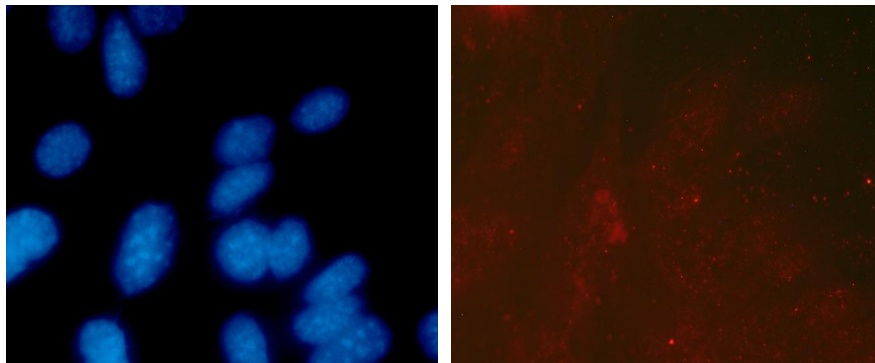


Fig. 6B– Immunofluorescenza su cellule MEF wild type controllo e trattate con la Leptomicina B (inibitore dell’esporto nucleo-citoplasma). È analizzata la fosforilazione di tau a livello del fosfo-epitopo AT100 (p-T212/p-S214). Il blocco dell’esporto nucleare determina una notevole riduzione di fosfo-tau a livello nucleare.

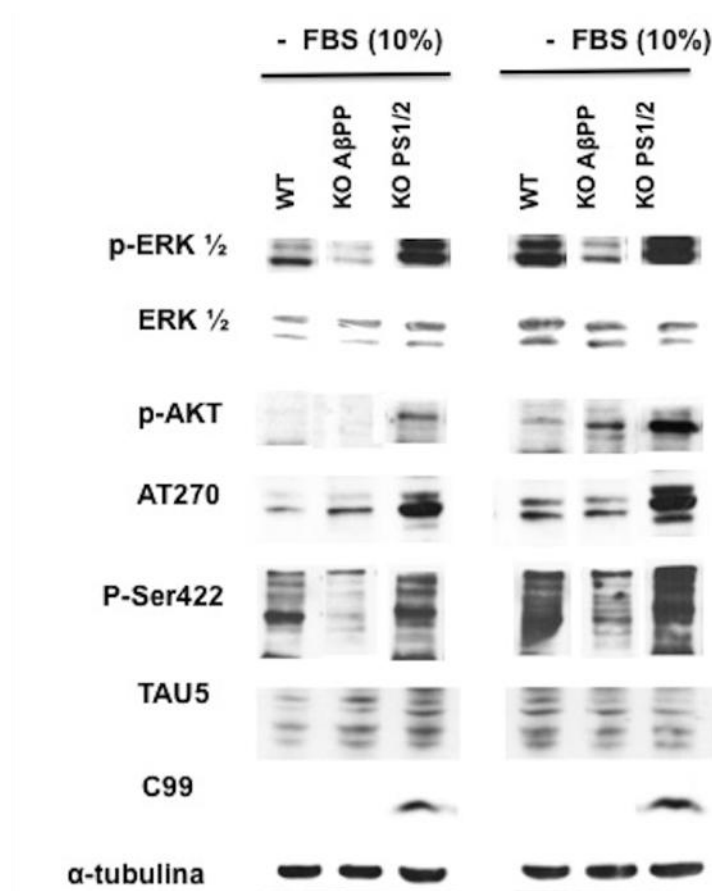
3.5.2 Attivazione di chinasi in dipendenza di A β PP

L’osservazione che A β PP (o i suoi CTFs) moduli la fosforilazione di tau ci lascia ipotizzare un effetto di A β PP sulle chinasi note come potenzialmente responsabili della fosforilazione di tau in diversi fosfoepitopi di tau; in particolare ERK1,2 e GSK3 β (Stoothoff et al, 2005). Abbiamo quindi analizzato il profilo di espressione delle chinasi ERK1,2 ed AKT1 (a monte di GSK3 β) nelle cellule MEF wt, KO A β PP e KO PS mediante western blotting su lisati proteici ottenuti da cellule starvate o attivate con stimolo mitogeno (FBS - siero fetale bovino, 10%) per 10 minuti (Fig. 7A). Abbiamo osservato che, in condizioni basali, l’attivazione delle chinasi ERK1,2 ed AKT1 è

nettamente maggiore nelle MEF KO PS, rispetto agli altri due cloni cellulari, e che le KO A β PP mostrano i livelli di fosforilazione più bassi. La fosforilazione di tau a livello del fosfo-epitopo p-Ser422 segue lo stesso andamento, mentre AT270 mostra una chiara iperfosforilazione solo nelle KO PS. Tali dati indicano che il mancato processing di A β PP (e quindi l'accumulo di CTFs o l'assenza di AICDs nel nucleo) ha chiaramente un ruolo nell'attivazione di ERK1,2 e di tau. Anche per quanto riguarda AKT1, abbiamo osservato un aumento della fosforilazione di AKT1 nelle KO PS rispetto agli altri due cloni. Come atteso, in tutti e tre i cloni cellulari abbiamo poi osservato una risposta di entrambe le chinasi, ERK1/2 e AKT1, allo stimolo mitogeno anche se, in proporzione, nelle MEF KO PS non si osserva un netto ulteriore incremento in condizione di stimolazione mitogena poiché l'attivazione di entrambe le chinasi è già particolarmente elevata in condizioni basali. Sorprendentemente, la fosforilazione di tau negli epitopi AT270 e p-Ser422 ha risposto alla stimolazione con FBS allo stesso modo delle chinasi (Fig. 7A).

Per confermare il pathway segnale a monte dell'attivazione di ERK1/2 e di AKT1 e quindi di fosfo-tau abbiamo trattato le cellule MEF KO PS, esponenti il fenotipo di attivazione di tali proteine più marcato, con un inibitore di MEK, il PD98056 (10 μ g/mL, 15 min), ed un inibitore di PI3K (LY294002 a 10 μ g/mL, 15 min). Entrambi gli inibitori, PD98056 ed LY294002, hanno ridotto l'attivazione delle chinasi ERK1,2 e AKT1 rispettivamente (Fig. 7B). Focalizzando l'attenzione su fosfo-tau (epitopo AT270) si osserva una sua ridotta attivazione in presenza del PD98056, indice che la Thr181 su tau viene probabilmente fosforilata da ERK1/2, mentre il trattamento con LY294002 ha mostrato solo una parziale riduzione della fosforilazione di tau in tale sito. Considerando che AKT1 è inibitoria nei confronti di GSK3 β , è ipotizzabile che, quest'ultima chinasi non sia responsabile della fosforilazione di tale epitopo di tau. Quanto osservato è in linea con il fenotipo di overespressione di A β PP analizzato fino ad ora, in cui GSK3 α/β risulta essere inattiva in quanto fosforilata da AKT1. In questo scenario la principale chinasi responsabile della fosforilazione di tau nell'epitopo Thr181 riconosciuto da AT270 (ma abbiamo dati analoghi per AT100) risulta quindi essere principalmente ERK1,2. Resta quindi da investigare il ruolo dell'attivazione di AKT1 mediata da A β PP, ed i pathway a valle da tale chinasi.

A



B

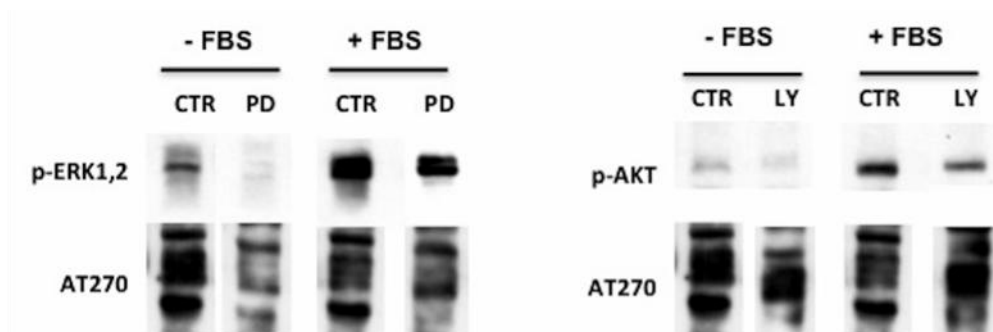


Fig. 7A– Western blot su cellule MEF wt, KO AβPP e KO PS starvate o attivate con stimolo mitogeno (FBS - siero fetale bovino, 10%) per 10 minuti. È analizzata la cinetica di attivazione delle chinasi p-ERK1,2 e p-AKT e di fosfo-epitopi di tau AT270 (p-Thr181) e p-Ser422 comparata con la quota totale di tau (TAU5). Come controllo dell'inibita attività γ-secretasica nelle MEF KO PS è mostrato il frammento C-99 accumulato. **Fig.7B** – Cellule MEF KO PS sono state trattate con l'inibitore di MEK, il PD98056 (10 μg/mL, 15 min), ed un inibitore di PI3K, LY294002 (10 μg/mL, 15 min) al fine di investigare i pathways segnale a monte della fosforilazione di tau. È investigata l'attivazione delle chinasi p-ERK1,2 e p-AKT e la fosforilazione di tau a livello dell'epitopo AT270 (p-Thr181).

3.5.3 Cinetica rapida di attivazione di ERK1,2 e di fosfo-tau

Considerando la rapida cinetica di attivazione della chinasi ERK1/2 in seguito a stimoli mitogenici (Rozengurt, 2007) e osservata la modulazione della fosforilazione di tau mediata da tale chinasi, abbiamo voluto investigare la corrispondente cinetica di attivazione di fosfo-tau. A tal fine abbiamo confrontato MEF wild-type, KO A β PP e KO PS1/2 in un time-course in cui le cellule sono state esposte per un tempo variabile (0-60 minuti) al siero fetale bovino (FBS) utilizzato come stimolo mitogeno. In parallelo, le cellule sono state inoltre trattate con il DAPT, un farmaco con azione inibitoria dell'attività γ -secretasica, in modo tale da valutare il ruolo dell'azione di tale secretasi nella cinetica di attivazione di tau e confermare quanto osservato nella linea cellulare KO PS. Tale trattamento non è stato, ovviamente, eseguito nelle MEF KO PS in quanto ridondante. Mediante western blot, abbiamo investigato la fosforilazione di tau a livello del fosfo-epitopo Thr181 (Fig. 8). In tutte e tre le linee cellulari, abbiamo osservato un crescente aumento della fosforilazione di tau in funzione all'aumentata esposizione delle cellule allo stimolo mitogeno, con un picco della fosforilazione dopo 15 minuti di stimolazione. Il blocco dell'azione γ -secretasica mediata dal DAPT ha indotto un ulteriore incremento della fosforilazione ad ogni tempo del time-course. Tale dato è stato confermato nelle MEF KO PS nelle quali abbiamo osservato una maggiore fosforilazione di tau rispetto agli altri due cloni cellulari in ogni punto del time course a partire dalla condizione basale al tempo zero. A differenza di quanto osservato in condizioni di assenza di PS, l'assenza di A β PP, nelle cellule KO per la tale proteina, ha mostrato una leggera ipo-responsività allo stimolo mitogenico in termini di fosforilazione di tau rispetto agli altri due cloni cellulari, in tutta la durata del time course; suggerendo nuovamente un ruolo di A β PP nel processo di fosforilazione di tau, anche in tempi rapidi di attivazione. Abbiamo quindi eseguito lo stesso tipo di esperimento andando ad analizzare la cinetica di attivazione di ERK1/2. In linea con quanto osservato per fosfo-tau, p-ERK1/2 ha risposto in maniera crescente allo stimolo del siero fetale bovino nonché all'azione del DAPT, mostrando un picco di attivazione dopo 15 minuti di stimolazione con il siero come atteso, e ad ogni punto del time course dopo inibizione dell'attività γ -secretasica (Fig. 8).

Per verificare ulteriormente in ruolo del DAPT sull'attivazione di ERK1,2 e tau, abbiamo analizzato in immunofluorescenza cellule MEF wt e KO A β PP trattate con DAPT, 5g/mL over-night e successivamente fissate e colorate con gli anticorpi specifici

per AT100 coniugato Alexa 488, p-ERK1/2 coniugato Alexa 568 e con il DAPI (marcatore nucleare) (Fig. 9). In questi studi si è confermato che il segnale nucleare di fosfo-tau nelle MEF wt è più intenso di quello delle MEF KO A β PP, e che tale segnale aumenta in condizione di inibizione dell'attività γ -secretasica dopo il trattamento con il DAPT. Ulteriore conferma è la parziale accensione extra-nucleare di fosfo-tau nelle MEF wt rispetto alle MEF KO A β PP, fenotipo che si accentua trattando le cellule con il DAPT. In linea con quanto riscontrato dall'analisi proteica mediante western blotting, il segnale di p-ERK1,2 si è rivelato particolarmente debole nelle MEF KO A β PP e molto più forte e modulato dall'inibizione dell'attività γ -secretasica nelle MEF wt. È interessante notare come nelle MEF wt trattate con il DAPT, il segnale di fosfo-ERK1,2 colocalizzi con quello di fosfo-Tau. Tali dati confermano quindi il ruolo di A β PP e del suo processing nella fosforilazione di ERK1,2 e di tau.

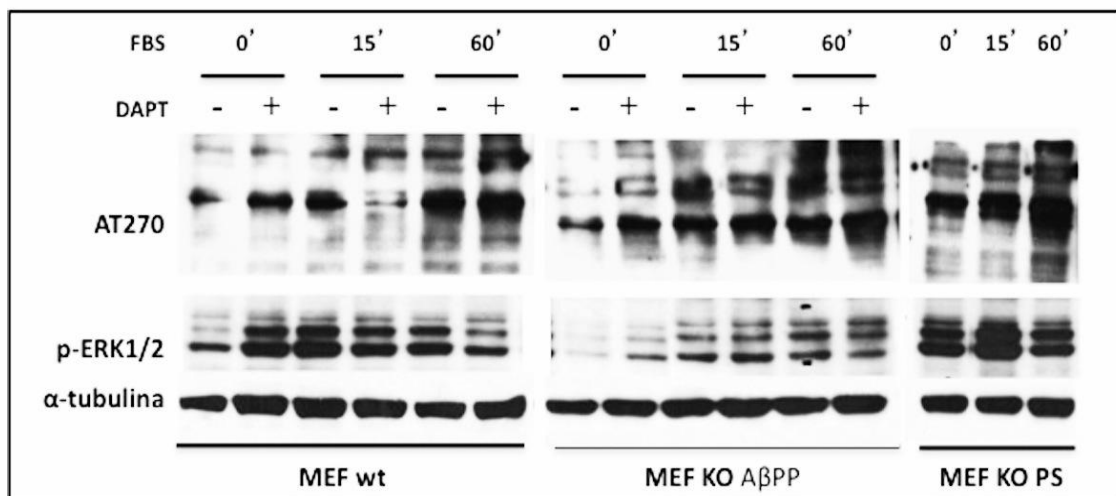


Fig. 8 - Western blot rappresentante la cinetica di fosforilazione di ERK1,2 (p-ERK1,2) e tau (fosfo-epitopo Thr-181; anticorpo AT270) in cellule MEF wt, KO A β PP e KO PS a diversi tempi di esposizione allo stimolo mitogeno del siero fetale bovino (FBS) e del trattamento con il DAPT (inibitore dell'attività γ -secretasica). Sia fosfo-ERK1/2 che fosfo-tau, mostrano una rapida cinetica di attivazione; l'assenza dell'attività γ -secretasica, sia nelle MEF KO PS, sia dopo il trattamento cellulare con il DAPT, induce una maggiore attivazione delle proteine analizzate, in condizioni basali e dopo stimolazione mitogena ad ogni punto del time course.

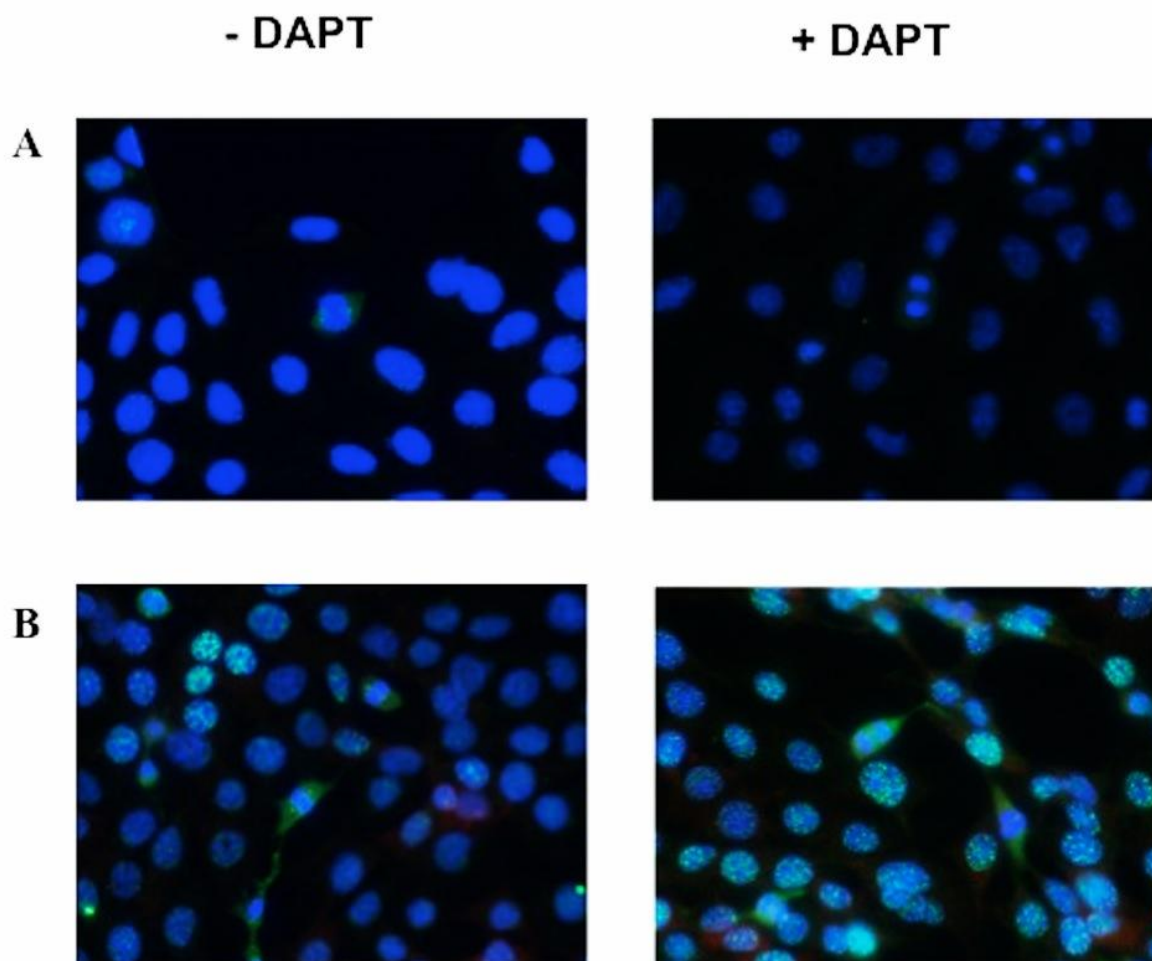


Fig. 9 - Cellule MEF wt e KO A β PP trattate con il DAPT (5g/mL, over-night) sono marcate con gli anticorpi specifici per AT100 (p-Thr212/p-Ser214) coniugato Alexa 488 (verde), fosfo-ERK1/2 coniugato Alexa 568 (red) e con il DAPI (marcatore nucleare). Il contributo di A β PP nelle MEF wt determina un segnale nucleare di fosfo-tau piú intenso con parziale accensione della sua quota extra-nucleare; tale fenotipo si accentua trattando le cellule con il DAPT. Anche il segnale di fosfo-ERK1,2 risulta essere piú intenso in condizioni di espressione di A β PP (MEF wt) e di inibizione dell'attività γ -secretasica (trattamento con il DAPT).

3.6 A β PP e tau come modulatori del ciclo cellulare

Considerato il ben noto ruolo di ERK1,2 nella proliferazione cellulare (Salameh et al., 2005) abbiamo voluto investigare il potenziale ruolo della proteina precursore dell'amiloide nell'attivazione del ciclo cellulare. A tale fine abbiamo condotto saggi di

MTT e di BrdU in cellule HEK293 overesprimenti A β PP695 confrontate con HEK293 con il vettore senza inserto, usate quindi come controllo (Fig. 10A-B). In entrambi i saggi, la linea cellulare overesprimente A β PP ha mostrato una maggiore crescita cellulare rispetto alla linea wt. Nel saggio MTT questa differenza è stata rilevata dal terzo giorno fino all'ultimo (il settimo); nel saggio BrdU, l'incorporazione di quest'ultima è risultata maggiore nelle HEK293 A β PP rispetto alle HEK293 controllo, sin dal primo giorno di analisi. In entrambi i saggi, si raggiunge lo steady state al settimo giorno di analisi (Fig. 10A-B).

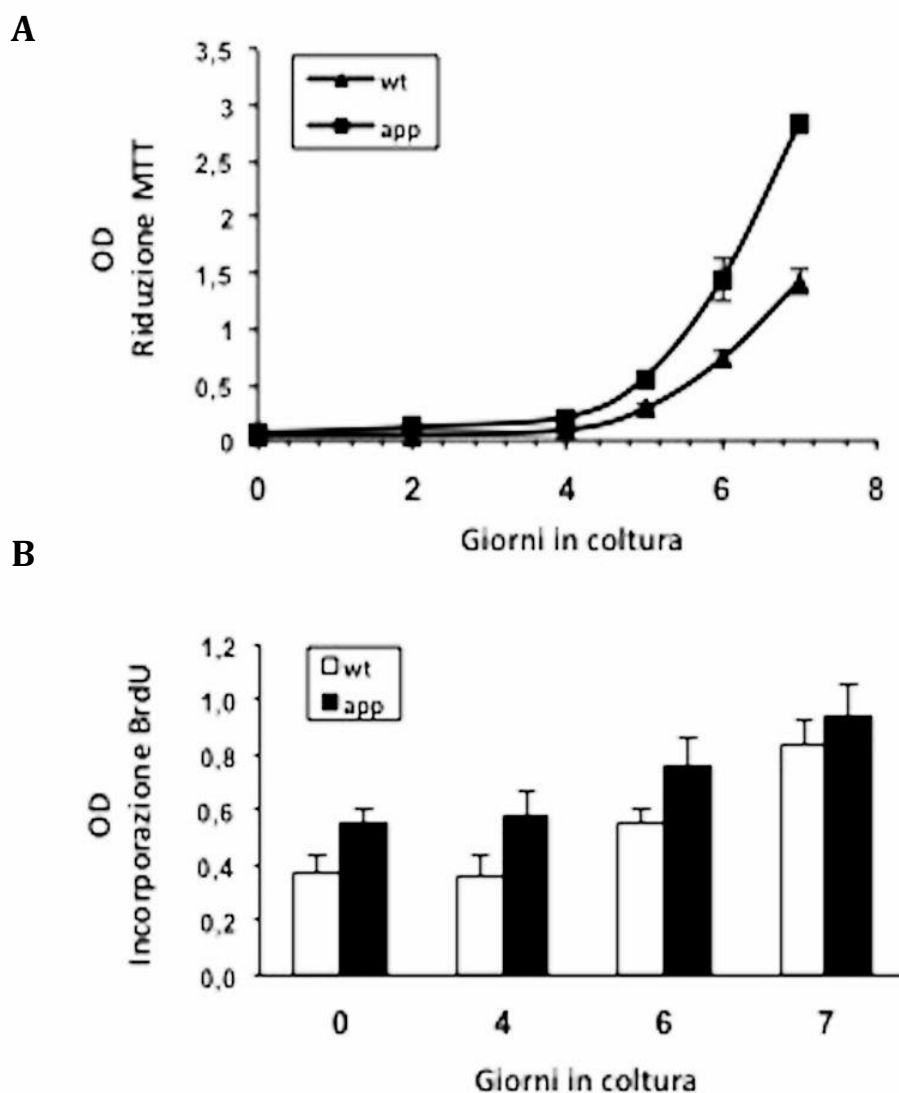


Fig. 10 - Riduzione dell'MTT (A) e incorporazione della BrdU (B) in cellule HEK293-overesprimenti stabilmente A β PP695 (APP) e cellule HEK293 wild type esprimenti il cDNA vuoto (pcDNA3). In entrambi i saggi (MTT e BrdU) l'overespressione di A β PP contribuisce ad una maggiore crescita cellulare.

3.7 Tau extranucleare e mitosi

Abbiamo successivamente voluto valutare la correlazione tra il ciclo cellulare e la fosforilazione di tau a livello citoscheletrico. A tale fine sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza in HEK293 bloccate nella fase G2M in seguito a trattamento con nocodazolo (12 ore, 500 ng/mL). Le cellule sono state poi fissate e marcate con l'anticorpo specifico per fosfo-ERK1/2 coniugato con Alexa 568 (rosso) e con l'anticorpo AT270 coniugato Alexa 488 (verde). La doppia colorazione ci ha permesso di osservare la contemporanea marcatura nucleare delle cellule in mitosi sia con fosfo-ERK1,2 sia con AT270; confermando quindi il coinvolgimento di tau nella fase mitotica del ciclo cellulare (Fig. 11A). Nella figura 11B sono messe in risalto MEF wt in piena mitosi marcate con l'anticorpo AT100 coniugato con Alexa 488 (verde) ed il DAPI (marcatore nucleare, in blu). In questa figura è evidente il segnale tipico nucleare di fosfo-tau (nuclear puncta) nelle cellule quiescenti, mentre nelle cellule in mitosi il segnale è de localizzato, molto accentuato ma non più in contatto con la cromatina. Si osserva anche una forte localizzazione di AT100 a livello dei centrosomi in metafase, profase e telofase (localizzazione non riscontrata con altri fosfo-epitopi di tau).

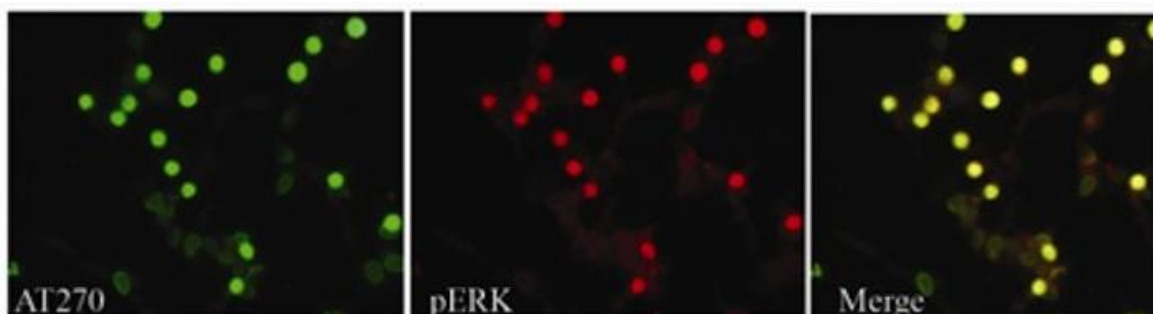


Fig. 11A - Cellule HEK293 wild type sono state bloccate in fase G2M con il nocodazolo (12 ore, 500 ng/ml) e successivamente marcate con l'anticorpo AT270 (p-Thr231) coniugato Alexa 488 (verde) e l'anticorpo specifico per fosfo-ERK1,2 coniugato Alexa 568 (rosso) usato come marcatore mitotico. La doppia colorazione mostra la contemporanea marcatura nucleare delle cellule in mitosi sia con fosfo-ERK1,2 sia con AT270.

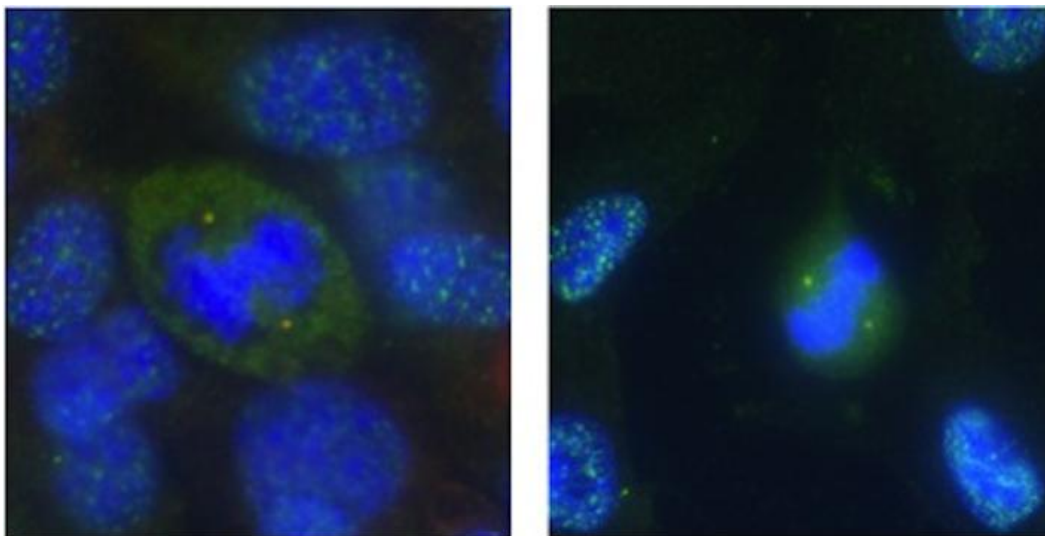
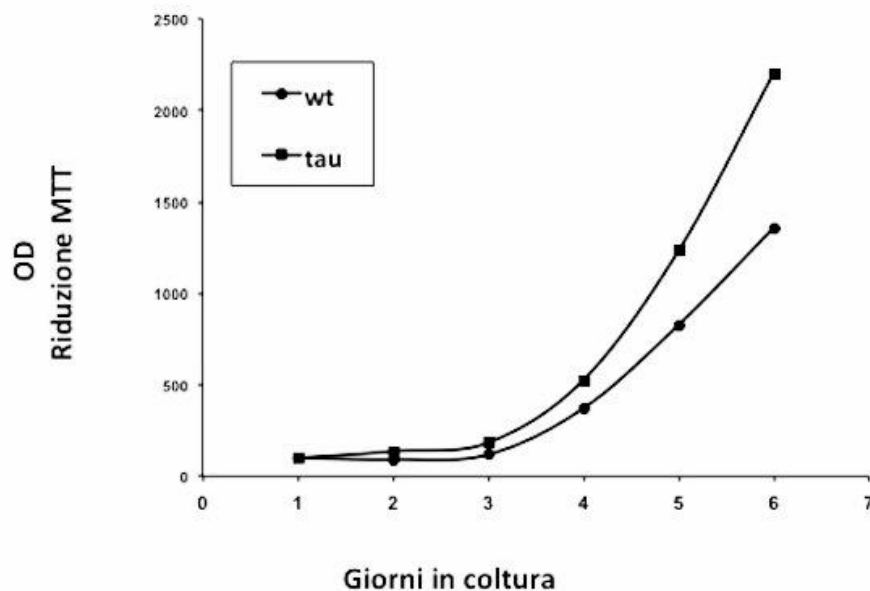


Fig. 11B - MEF wt in piena mitosi marcate con l'anticorpo AT100 (p-Thr212/p-Ser214) coniugato Alexa 488 (verde) ed il DAPI (marcatore nucleare, segnale blu). È evidente il segnale tipico nucleare di fosfo-tau (nuclear puncta) nelle cellule quiescenti ed un segnale molto accentuato ma non più in contatto con la cromatina nelle cellule in mitosi. Si osserva anche una forte localizzazione di AT100 a livello dei centrosomi in metafase, profase e telofase.

Abbiamo poi comparato la crescita cellulare di cellule HEK293 wt in rapporto a cellule HEK293 over-esprimenti tau. Come mostrato dal grafico, l'overespressione di tau (isoforma 4R2N) determina una maggiore proliferazione cellulare rispetto alle cellule che non la overesprimono (Fig. 11C). Al fine di valutare lo stato di fosforilazione della tau overespressa, abbiamo successivamente condotto un esperimento di immunofluorescenza in cui abbiamo trasfettato cellule MEF KO PS con un vettore codificante tau fusa con la GFP e le abbiamo marcate con l'anticorpo AT270 coniugato Alexa 356 specifico per il fosfo-epitopo Thr181 (Fig. 11D). Abbiamo osservato che la tau 4R2N, localizzata solo a livello citoscheletrico, è completamente fosforilata; tale dato conferma ulteriormente quanto osservato nella figura 11B. I dati quindi suggeriscono che un aumento del rapporto citoscheletrico/nucleare di tau di per sé è correlabile (soprattutto in cellule prive di γ -secretasi) con un aumento della progressione del ciclo cellulare.

11C



11D

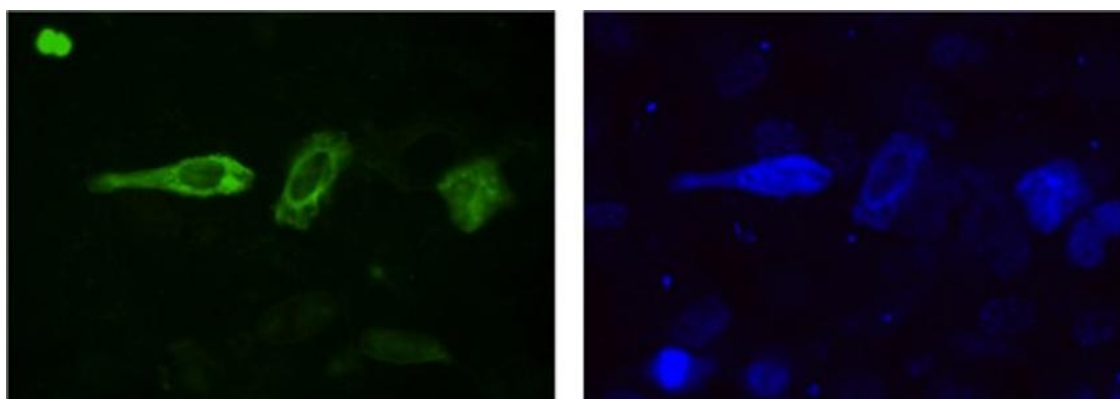


Fig. 11C – Saggio MTT eseguito su cellule HEK293 wt e overesprimenti tau (isoforma 4R2N). L'overespressione di tau determina una maggiore proliferazione cellulare rispetto alle cellule che non la overesprimono. **Fig. 11D** – Immunofluorescenza su cellule MEF KO PS overesprimenti tau taggata con la GFP (isoforma 4R2N). Al segnale verde corrisponde la colorazione data dalla tau-GFP; il segnale blu rispecchia la fosforilazione di tau a livello del fosfo-epitopo Thr181 (anticorpo AT270 coniugato Alexa 356). La tau 4R2N, overespressa nelle cellule MEF KO PS, localizzata solo a livello citoscheletrico, è completamente fosforilata.

3.8 Overespressione di A β PP e morte cellulare in neuroni.

Per verificare il ruolo di A β PP nella fosforilazione di tau in un modello di cellule differenziate, abbiamo utilizzato la linea cellulare murina embrionale mesencefalica A1 (mes-c-myc A1) che prolifera e resta non differenziata quando viene cresciuta in presenza di siero, mentre differenzia in senso neuronale, cessando di proliferare, quando viene cresciuta in condizioni prive di siero e in presenza di cAMP. In questo modello abbiamo potuto verificare se l'espressione di A β PP fosse correlabile con una ripresa del ciclo cellulare in cellule differenziate. Le cellule A1 sono state transfettate con il vettore codificante A β PP-GFP e mediante immunofluorescenza è stata investigata la fosforilazione di tau mediata da A β PP, colorando le cellule con l'anticorpo AT270 coniugato Alexa 568 (Fig. 12A). In linea con quanto riscontrato nelle cellule MEF, anche le cellule A1 hanno mostrato uno spegnimento del segnale nucleare di fosfo-tau in condizioni di overespressione di A β PP. Per verificare la funzione dell'overespressione di A β PP in tale linea cellulare abbiamo eseguito una conta cellulare mediante l'utilizzo del trypan blue che ci ha permesso di misurare la percentuale di mortalità cellulare indotta dall'overespressione di A β PP (Fig. 12B). Abbiamo misurato una riduzione della vitalità cellulare del 44% dopo 48 ore dalla trasfezione cellulare con la proteina A β PP. Questi dati suggeriscono che l'overespressione di A β PP non determina una ripresa del ciclo cellulare, ma anzi determina, come anche in cellule proliferanti, una riduzione della fosforilazione a livello nucleare ed un aumento della mortalità cellulare. E' importante notare che in esperimenti paralleli abbiamo misurato un'alta mortalità nelle cellule A1 esprimenti A β PP-GFP rispetto alle cellule transfettate solo con la GFP. Indicando che la presenza di A β PP in cellule differenziate induce un aumento della mortalità.

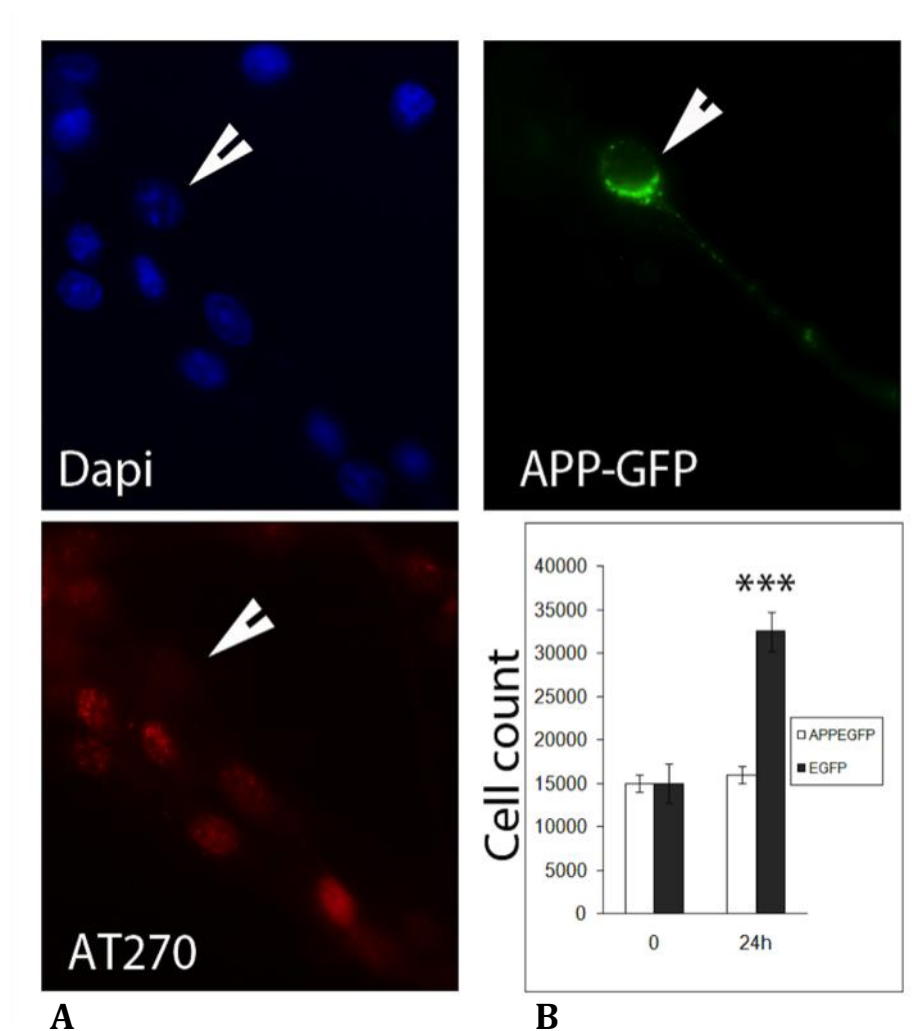


Fig. 12A - Immunofluorescenza sulle cellule A1 mes-c-myc trasfettate con A β PP-GFP. Le cellule overesprimenti A β PP mostrano, rispetto alle cellule non trasfettate, una significativa riduzione del segnale nucleare. **Fig. 12B** - Il grafico compara la sopravvivenza delle cellule trasfettate con A β PP-GFP e quelle controllo, trasfettate solo con la GFP; è evidente la significativa riduzione della vitalità cellulare in condizioni di overespressione di A β PP.

3.9 Selenato di sodio per la riduzione della fosforilazione ed aggregazione di tau in un modello di tauopatia umana.

3.9.1 Selenato di sodio e riduzione della fosforilazione di tau

Ipotizzando quindi un ruolo importante delle chinasi ERK1,2 ed AKT1 nella fosforilazione di tau in dipendenza di A β PP, abbiamo investigato la modulazione della fosforilazione di tau da parte di un composto chimico, il selenato di sodio (attivatore dell'attività fosfatasica), in topi transgenici modello di tauopatia umana. Si tratta di un modello murino esprimente l'isoforma umana di tau 4R0N (383 aa) portatrice della mutazione P301S, in un background C57BL/6J.

Sebbene il modello murino P301S tau da noi utilizzato sia stato già in precedenza caratterizzato a livello macroscopico, in termini di neurodegenerazione cerebrale e nel midollo spinale e, a livello microscopico, in termini di iperfosforilazione di tau (Goedert M., 2002), abbiamo comunque analizzato la fosforilazione di tau comparandola con topi non-transgenici ma con il medesimo background genetico. L'analisi è stata eseguita su tessuti cerebrali e su midollo spinale mediante la tecnica del western blot, su due diverse frazioni proteiche, solubile ed insolubile, al fine di avere informazioni anche in termini di eventuali inclusioni insolubili formate da tau (Hirata-Fukae et al., 2009). Poiché riguardo al midollo spinale abbiamo dati preliminari non confermati, illustreremo soltanto i dati relativi ai tessuti cerebrali. Abbiamo investigato la fosforilazione di diversi epitopi di tau riconosciuti dai seguenti anticorpi: AT100 (p-Thr212-pSer214), AT8 (pSer202-pThr205), AT270 (p-Thr181) e p-Ser422 (Fig. 13). Il modello murino transgenico P301S tau ha confermato avere elevati livelli di fosforilazione della tau solubile ed insolubile a livello di tutti i fosfo-epitopi investigati.

Abbiamo successivamente analizzato la modulazione di tale fosforilazione da parte del sodio selenato ($\mu\text{g/mL}$), quale attivatore di fosfatasi e quindi in grado, potenzialmente, di revertire l'iperattivazione di tau. Mediante western blot abbiamo osservato una significativa riduzione della fosforilazione della quota insolubile di tau a livello di tutti i fosfo-epitopi analizzati (Fig. 14).

Stesso dato è stato confermato mediante la tecnica di immunistoichimica con la quale è stata focalizzata la nostra attenzione sulla regione cerebrale del nucleo pontino, rappresentante una delle regioni cerebrali maggiormente esprimenti il fenotipo patologico neurodegenerativo di tale modello murino. Fettine cerebrali ottenute da topi transgenici

P301S tau trattati con veicolo (H_2O) e trattati con il selenato di sodio (NaSel) sono state colorate con gli anticorpi AT100 e p-Ser422 coniugati Alexa 568 e con il DAPI (marcatore nucleare) (Fig. 15A-B). Per la fosforilazione dell'epitopo Ser422 è stata effettuata anche una co-marcatore con l'anticorpo HT7 coniugato Alexa 488 specifico per la tau totale (fosforilata e non fosforilata) (Fig. 15B). Abbiamo, innanzitutto, osservato nei topi transgenici controllo (H_2O) un'elevata fosforilazione di tau, localizzata principalmente a livello extranucleare, con presenza di numerosi aggregati neurofibrillari. Il trattamento dei topi con il selenato di sodio ha ridotto notevolmente la fosforilazione della quota citosolica/citoscheletrica di tau ed il corrispondente numero di inclusioni extra-nucleari.

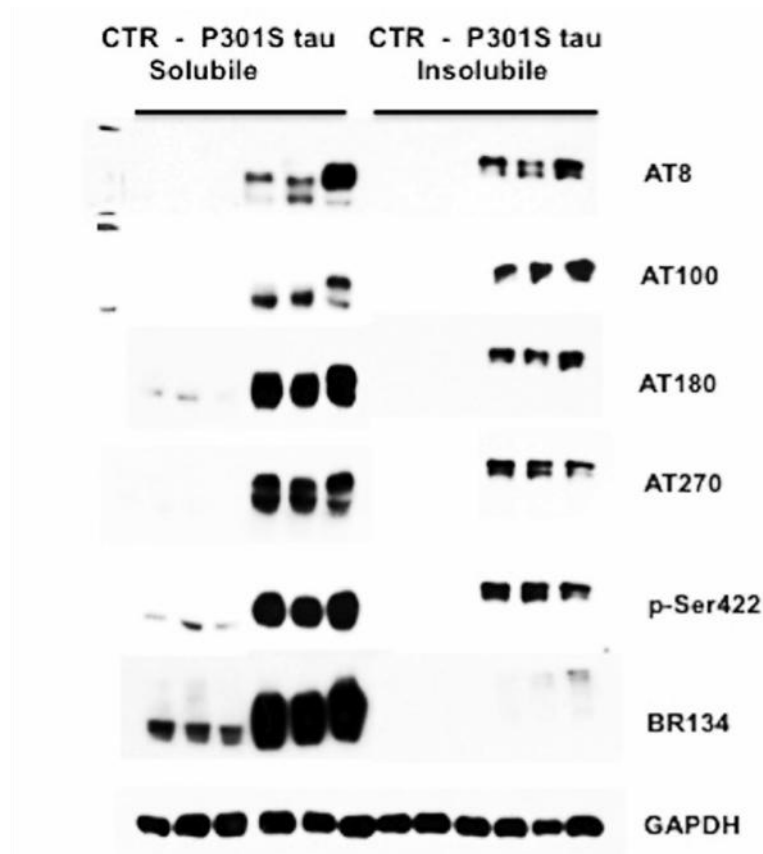


Fig. 13 – Caratterizzazione della fosforilazione di epitopi di tau riconosciuti dagli anticorpi AT100 (p-T212/p-S214), AT8 (p-S202/p-T205), AT270 (p-T181) e p-Ser422 in un modello murino esprimente l'isoforma umana di tau 4R0N (383 aa) portatrice della mutazione P301S (background C57BL/6J). È mostrato il confronto con la linea murina controllo, non transgenica.

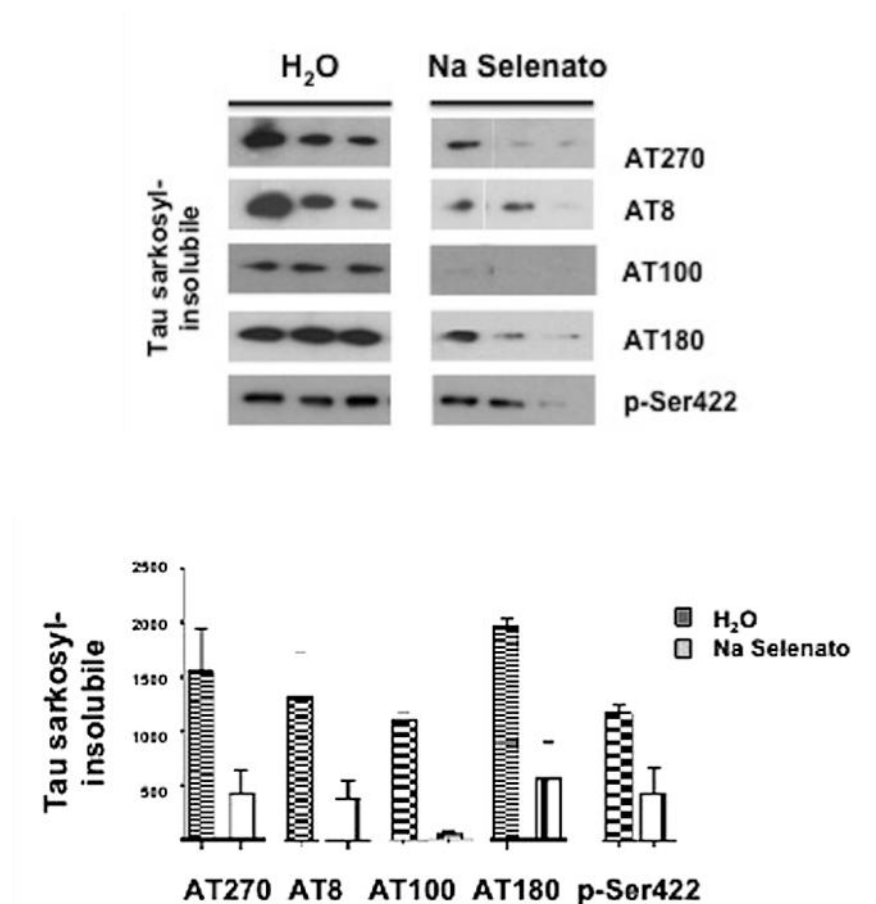


Fig. 14 - Caratterizzazione della fosforilazione della quota insolubile di tau a livello di epitopi riconosciuti dagli anticorpi AT270 (p-T181), AT8 (p-S202/p-T205), AT100 (p-T212/p-S214), AT180 (p-T231) e p-Ser422 nel modello murino P301S trattato con il Selenato di sodio (2 $\mu\text{g/mL}$). Si osserva una significativa riduzione della fosforilazione della quota insolubile di tau a livello di tutti i fosfo-epitopi analizzati.

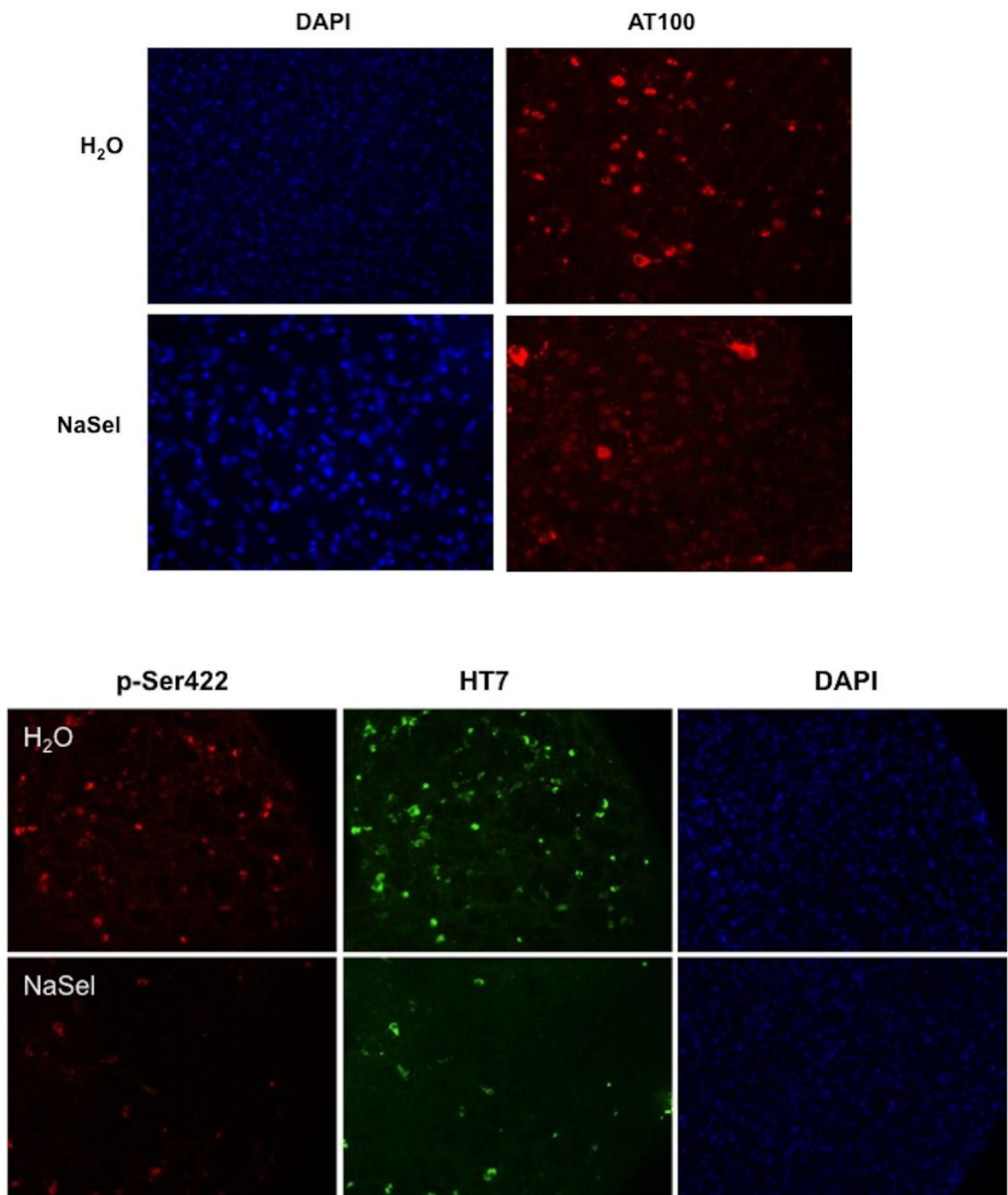


Fig. 15 - Immunoistochimica su fettine tissutali cerebrali dei due gruppi murini posti a confronto (H₂O e Selenato di sodio). **A)** È mostrata la colorazione di fosfo-tau a livello del fosfo-epitopo Thr212 e Ser214 (anticorpo AT100 coniugato Alexa 568; segnale rosso) e del nucleo (DAPI). **B)** È mostrata la colorazione di fosfo-tau a livello del fosfo-epitopo Ser422 (anticorpo p-Ser422 coniugato Alexa 568; segnale rosso) e di tau totale (anticorpo HT7, riconoscente la forma fosforilata e non fosforilata di tau). Il trattamento dei topi con il Selenato di Sodio riduce notevolmente la fosforilazione extranucleare di tau a livello di entrambi i fosfo-epitopi patogenetici analizzati, con corrispondente riduzione delle inclusioni di tau riconosciute specificamente dall'anticorpo AT100.

Con le stesse tecniche, western blot ed immunistoichimica, è stata caratterizzata anche la fosforilazione della quota solubile di tau. Abbiamo osservato un'azione del selenato di sodio anche a livello della quota solubile di fosfo-tau; a differenza però di quanto osservato per la quota insolubile, l'effetto generato dal farmaco sulla quota solubile non è risultato significativo, eccetto che per i fosfo-epitopi AT270 e, pur con una certa variabilità, AT8 (Fig. 16).

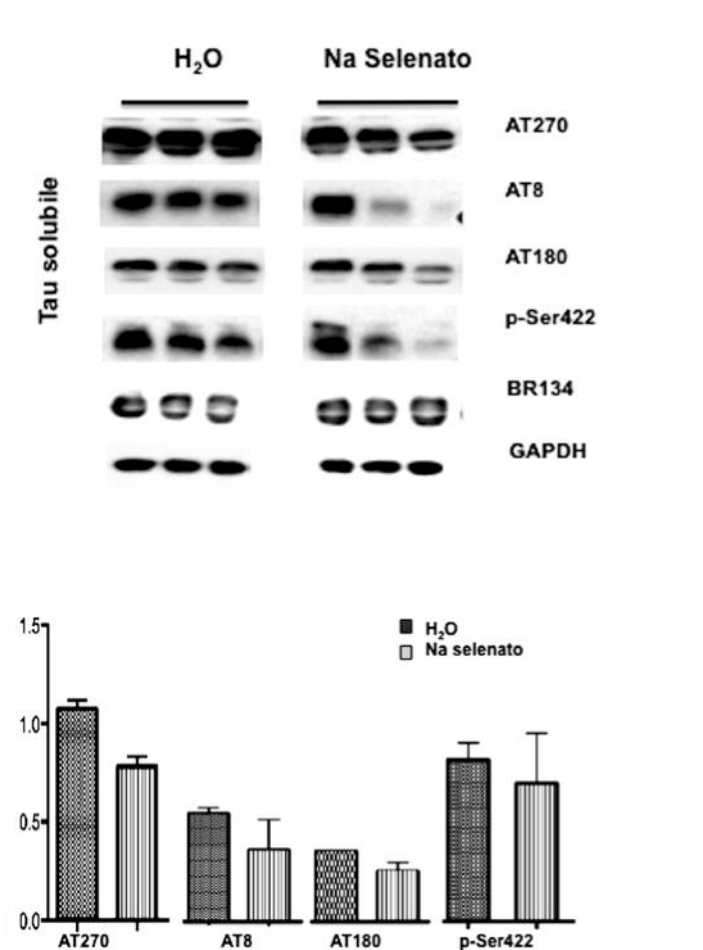


Fig. 16 - Caratterizzazione della fosforilazione della quota solubile di tau a livello di epitopi riconosciuti dagli anticorpi AT270 (p-T181), AT8 (pS202-pT205), AT180 (p-Thr231) e p-Ser422 nel modello murino P301S trattato con il selenato di sodio (2 µg/mL). Si osserva una riduzione della fosforilazione della quota solubile di tau a livello di tutti i fosfo-epitopi analizzati, che risulta, però, significativa solo a livello del fosfo-epitopo Thr-181 (AT270).

3.9.2 Selenato di sodio come attivatore della fosfatasi PP2A

Abbiamo successivamente investigato il potenziale meccanismo molecolare attraverso il quale tale molecola potrebbe agire per ridurre la fosforilazione di tau. Alla luce di quanto già dimostrato da altri gruppi di ricerca (van et al., 2010), abbiamo investigato l'attivazione dell'attività enzimatica della fosfatasi PP2A.

Abbiamo analizzato i lisati proteici cerebrali del modello murino P301S tau utilizzando un anticorpo specifico per la forma inattiva di PP2A, il cui segnale è stato normalizzato utilizzando un anticorpo riconoscente entrambe le forme, attiva e inattiva, della stessa. Abbiamo riscontrato che il selenato di sodio riduce la quota inattiva di PP2A, inducendo quindi l'attività fosfatasica di PP2A nei confronti di fosfo-tau (Fig. 17).

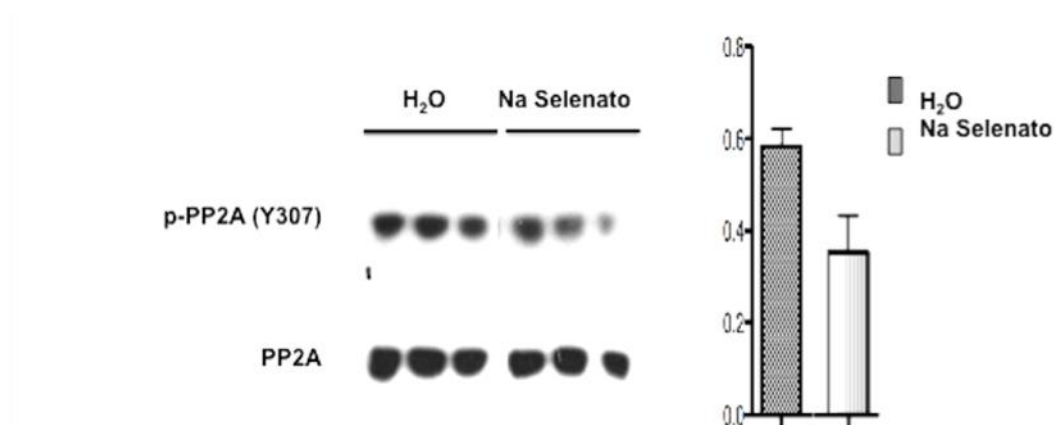


Fig. 17 - Investigazione della fosforilazione di PP2A a livello del residuo Y307 corrispondente all'inibizione della sua attività fosfatasica nel modello murino P301S trattato con il selenato di sodio (2 µg/mL). Si osserva una significativa riduzione della forma inattiva di PP2A normalizzata con la relativa quota totale (forma attiva e inattiva).

3.9.3 Selenato di sodio e attivazione indiretta dell'autofagia

Considerando l'attivazione di PP2A mediata dal selenato di sodio ed il potenziale ruolo di PP2A anche nell'attivazione dell'autofagia (Magnaudeix et al., 2013), ci siamo chiesti se il selenato di sodio potesse agire, oltre che come fosfatasi diretta su tau, anche sul processo autofagico della stessa tau attraverso PP2A. L'attivazione dell'autofagia è stata investigata misurando la modificazione conformazionale di LC3 (proteina associata ai microtubuli 1) comunemente usato come marcatore della formazione degli autofagosomi (Kabeya et al., 2000; Mizushima et al., 2007). Su gel SDS-PAGE, LC3 migra in una forma inattiva a 16 KDa, nota come LC3-I e una forma attiva a circa 14 KDa, derivante da modifiche post-traduzionali, nota come LC3-II. La presenza, nonché l'entità dell'isoforma II di LC3, è associata con l'attivazione del processo autofagico ed in particolare con la formazione degli autofagosomi. Analizzando i lisati protetici mediante SDS-PAGE dei campioni del modello murino P301S tau trattato con il selenato di sodio abbiamo avuto conferma dell'attivazione dell'autofagia da parte di tale droga dall'evidenza in blot della banda corrispondente all'isoforma II di LC3 (Fig. 18A).

Ulteriore conferma è stata avuta mediante la tecnica di immunoistochimica, dove l'attivazione dell'autofagia è stata rilevata dalla presenza di vescicole citoplasmatiche corrispondenti agli autofagosomi. Fettine tissutali cerebrali dei due gruppi murini posti a confronto (H_2O e selenato di sodio) sono state colorate con un anticorpo specifico per LC3 I-II coniugato Alexa 488 e con il DAPI per la colorazione nucleare (Fig. 18B). In linea con quanto rilevato dai blot, abbiamo osservato la presenza di autofagosomi nelle fettine cerebrali dei topi trattati con il selenato di sodio, indice di una potenziale attivazione del processo autofagico mediata da tale droga via PP2A.

Al fine di valutare se tau potesse essere un potenziale substrato del processo autofagico attivato dal selenato di sodio, abbiamo eseguito una doppia colorazione delle fettine cerebrali con LC3 coniugato Alexa 488 e i fosfo-epitopi AT100 (Fig. 19A) e AT180 (Fig. 19B) coniugati Alexa 568. Entrambe le colorazioni per AT100 e AT180 hanno mostrato, una chiara co-localizzazione dei due segnali, quello di LC3 e quello di fosfo-tau. Quest'ultima osservazione lascia supporre che anche l'autofagia potrebbe essere un potenziale meccanismo di degradazione di tau.

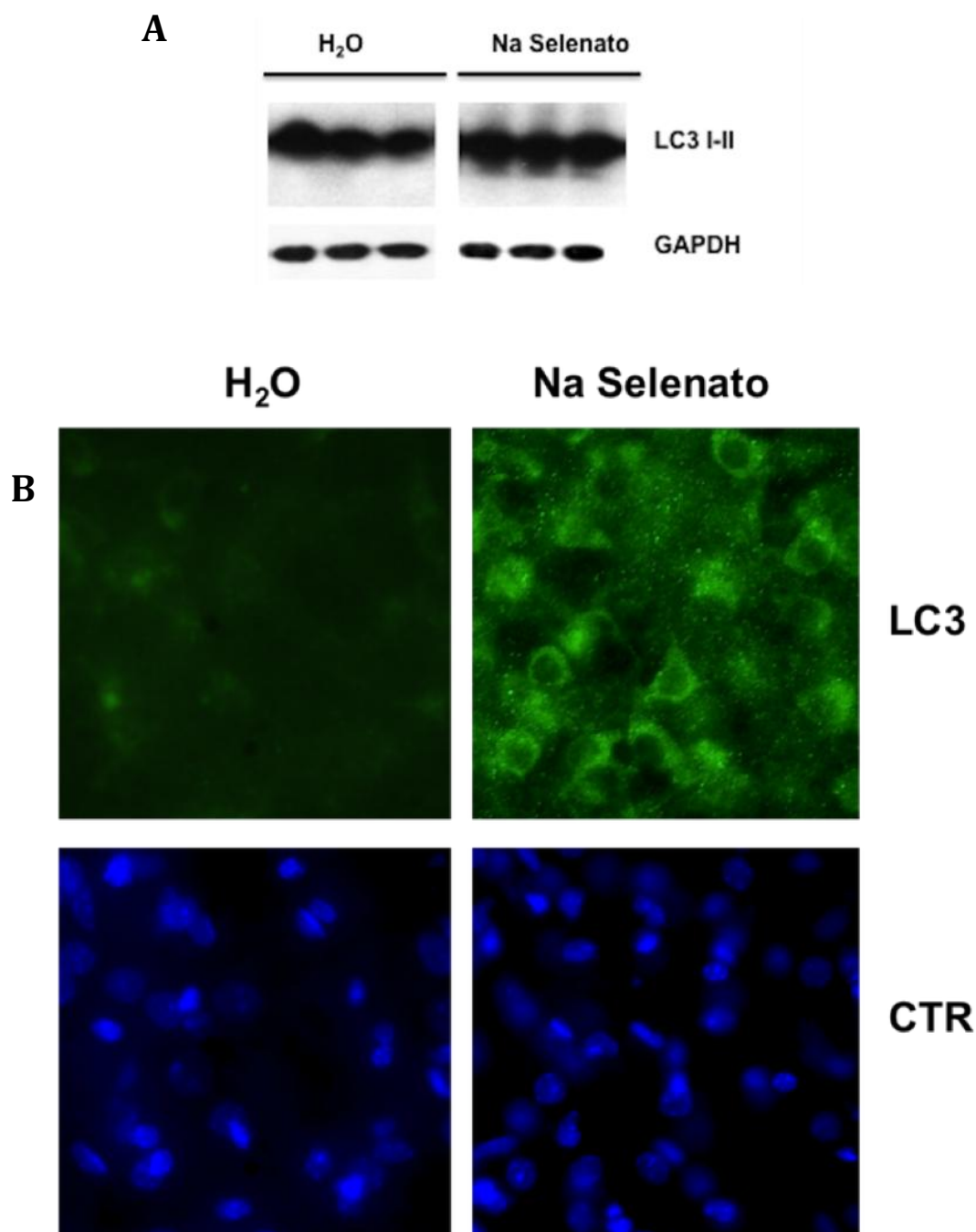


Fig. 18 – **A)** Investigazione della modificazione conformazionale di LC3 (marcatore della formazione degli autofagosomi) nel modello murino P301S trattato con il selenato di sodio (2 µg/mL). La presenza della banda più piccola a 14 KDa corrispondente all'isoforma II di LC3, è associata con l'attivazione del processo autofagico. **B)** Immunoistochimica su fettine tissutali cerebrali dei due gruppi murini posti a confronto (H₂O e selenato di sodio). In verde è mostrata la colorazione specifica di LC3 I-II coniugato Alexa 488 (in blu, il segnale dato dalla marcatura nucleare con il DAPI). Nelle fettine cerebrali dei topi trattati con il selenato di sodio sono osservabili vescicole citoplasmatiche corrispondenti agli autofagosomi.

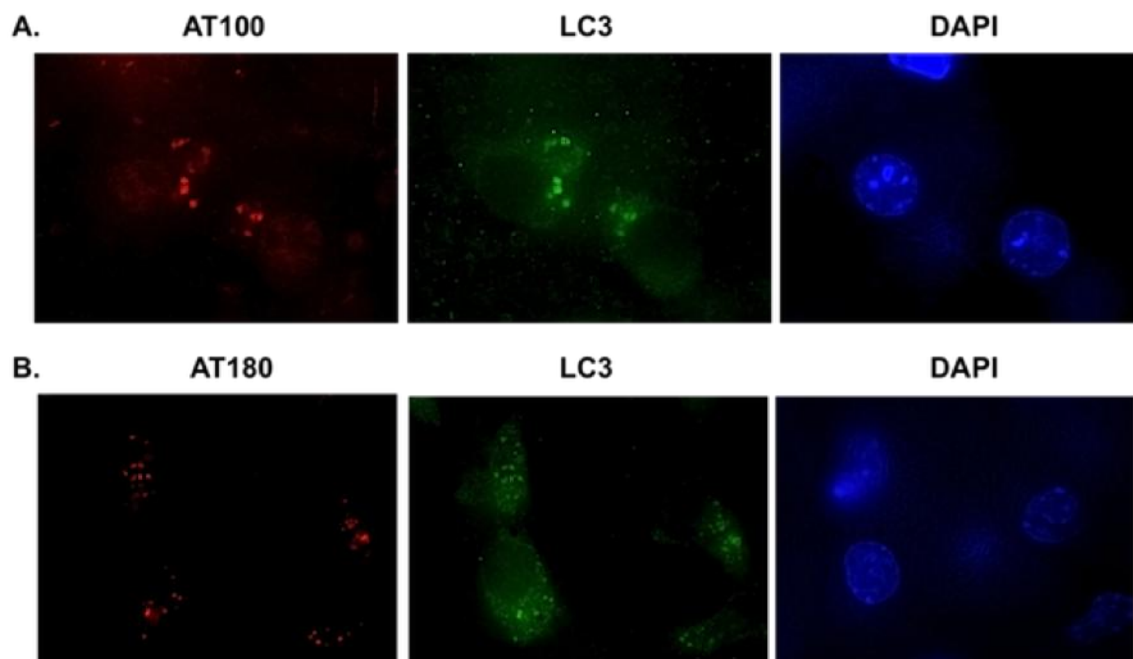


Fig. 19 - Immunoistochimica su fettine tissutali cerebrali del gruppo murino trattato con il selenato di sodio. È mostrata una doppia colorazione con LC3 coniugato Alexa 488 (verde) e i fosfo-epitopi AT100 (**A**) e AT180 (**B**) coniugati Alexa 568 (rosso). Entrambe le colorazioni per AT100 (p-Thr212/p-Ser214) e AT180 (p-Thr231) hanno mostrato, una chiara co-localizzazione dei due segnali, quello di LC3 e quello di fosfo-tau.

Capitolo 4

DISCUSSIONE

La demenza di Alzheimer è caratterizzata dalla contemporanea presenza a livello cerebrale di neurodegenerazione, amiloidosi e presenza di aggregati intracellulari di tau iperfosforilata. Dal punto di vista genetico A β PP riveste un'importanza primaria in quanto proteina precursore dei peptidi A β responsabili dell'amiloidosi, nonché per le forme familiari causate o da una sua overespressione (sia in forme familiari con mutazioni sul gene di A β PP sia nella trisomia 21) o da mutazioni nei siti di processing da parte di β - e γ -secretasi (Kowalska et al., 2003; De Jonghe et al., 2001; Theuns et al., 2006). Gli altri due geni su cui insistono numerosissime mutazioni causative di forme familiari di AD sono le preseniline 1 e 2 (PSs), componenti dell'enzima γ -secretasi e quindi, indirettamente riconducibili ad A β PP; anche se i substrati su cui agisce γ -secretasi sono molteplici e coinvolti nella regolazione di diversi pathways di segnale (De Strooper et al., 2010; Bertram et al., 2010). Per quanto riguarda tau invece non si hanno dati riguardanti mutazioni che causano forme familiari di AD, ma sono note mutazioni che causano altre forme di demenza note come tauopatie, in cui la neurodegenerazione sembra causata direttamente da aggregati intracellulari di tau iperfosforilata (esattamente come nell'AD), ma in assenza di amiloidosi da A β (Goedert et al., 2011). In questo quadro sembra quindi che A β PP e tau non siano direttamente correlabili, se non considerando (come avviene nella cosiddetta "ipotesi dell'amiloide") che la fosforilazione ed aggregazione di tau possa essere indotta da A β (Hardy and Selkoe, 2002). Tuttavia, dati recenti hanno messo in dubbio l'"ipotesi dell'amiloide". In particolare, studi clinici basati sull'immunizzazione attiva o passiva contro A β hanno dimostrato che la riduzione del carico cerebrale di amiloide non corrisponde ad una riduzione della gravità della demenza (Ferrer et al., 2004). Inoltre, esperimenti basati sull'utilizzo di una nuova generazione di topi transgenici knockout condizionali per PS1 hanno mostrato neurodegenerazione e NFTs in assenza di A β (Saura et al., 2004, Shen e Kelleher, 2007), suggerendo che una "*loss of function*" di

PSs sia la causa dell'AD. Quest'ultimo aspetto è difficilmente correlabile con l'amiloidosi (che sarebbe più correlabile ad una "*gain of function*" di γ -secretasi su A β PP) se non facendo riferimento ad una preferenza di taglio a-specifico su A β PP identificabile con una perdita di funzione di PSs (Shen and Kelleher, 2007; Heilig et al, 2010; De Strooper, 2007; Wolfe, 2007; Chávez-Gutiérrez 2012). Negli ultimi dieci anni diversi laboratori hanno proposto una teoria parallela, complementare a quella dell'"ipotesi dell'amiloide", in cui A β PP, agendo da recettore di superficie, modula un segnale (ancora non ben definito) la cui alterazione potrebbe perturbare l'omeostasi cellulare e causare danno neuronale (Gao et al., 2001; Venezia et al., 2004; Nizzari et al., 2007; Venezia et al., 2007). A questo proposito, è stato già dimostrato che l'overespressione di A β PP può indurre una cascata di trasduzione del segnale che induce un'anormale attivazione di MAPK ERK1,2 ed una aumentata crescita cellulare (Nizzari et al., 2007; Nizzari et al., 2012). In questo lavoro di tesi di Dottorato abbiamo ulteriormente approfondito questo aspetto, evidenziando come l'overespressione di A β PP, o il blocco del suo normale processamento indotto da una "loss of function" di PS, moduli la distribuzione di fosfo-tau tra i pools citoscheletrico e nucleare; uno step probabilmente richiesto per la regolazione del ciclo cellulare (Vincent et al., 1998; Preuss 1998; Illenberger et al., 1998).

Nel nostro studio si è posto l'accento proprio su tre diversi aspetti:

1-il fatto che la fosforilazione ed aggregazione di tau possa essere correlata ad A β PP, (anche senza far riferimento ad A β), in maniera molto più diretta attraverso una attività di signalling, mediata appunto da A β PP, finalizzata all'attivazione di chinasi specificamente riconducibili a tau;

2-il fatto che il fenotipo di overespressione di A β PP (come è noto di per sé associato alla generazione di AD sia in forme familiari sia nella sindrome di Down) sia correlabile alla fosforilazione di tau in maniera indipendente dalla formazione di A β ed, in ultimo

3-il fatto, già noto ma poco investigato, della presenza di un pool nucleare e di un pool citoscheletrico di tau il cui relativo equilibrio/rapporto potrebbe essere modulato da A β PP, dal suo processing e sia associabile ad un fenotipo di morte neuronale ed AD.

La fosforilazione di Tau è importante nella patogenesi della demenza di Alzheimer e nelle tauopatie in quanto una sua iper-fosforilazione è responsabile della formazione dei "*neurofibrillary tangles*" (NFTs) o aggregati neurofibrillari che causano il collasso del citoscheletro e l'interruzione del trasporto assonale. Questi due eventi sono responsabili della degenerazione neuronale, sinaptica e quindi della demenza (Iqbal and Grundke-Iqbal,

2008). La proteina Tau ha moltissimi siti di fosforilazione, noti per essere patogenicamente correlati con la formazione dei PHF e dei tangles, e che sono bersaglio di differenti chinasi. Da dati in letteratura e utilizzando un apposito software per la determinazione dei siti di fosforilazione (Scansite <http://scansite.mit.edu>) si scopre ad esempio che sulla tau sono identificabili circa 60 siti di fosforilazione e che in particolare:

- p38, JNK, ERK1,2, AKT possono fosforilare la Thr 153, Thr 205, Thr 212, Ser 214;
- GSK3 β , ERK1,2 possono fosforilare la Thr 181, Thr 231;
- cdc2, CDK5 possono fosforilare la Ser 202, Thr 205, Ser 396, Ser 404;
- GSK3 β , CDK5 possono fosforilare la Ser 199, Ser 202, Thr 205, Thr 212.

(Per una lista completa vedi anche <http://www.phosphosite.org>).

Alcuni di questi siti sono noti per essere fosforilati in condizioni patologiche nei NFT quali Ser 202 (AT8), Thr 231 (AT180), Ser 400 e Ser 404, Ser 396 e Ser 404 (PHF1), Thr 181 (AT270), Thr 212 e Ser 214 (AT100).

Dalla letteratura si evince anche che la fosforilazione di alcuni di questi siti, in particolare di Ser 202, Thr 205, Thr 181 e Ser 214, potrebbe essere anche indotta in condizioni fisiologiche durante la mitosi (Illenberger et al., 1998).

Gli esperimenti condotti nelle cellule MEF KO A β PP, in cui abbiamo overespresso A β PP-GFP (verde o rossa) dimostrano che solo nelle cellule transfettate si osserva una ridistribuzione della quota fosforilata di tau, con riduzione della quota nucleare a favore del pool citoscheletrico sia per i residui Thr 212 e Ser 214, riconosciuti dall'anticorpo AT100, sia per il residuo Thr 181 riconosciuto dall'anticorpo AT270 (Fig 1 A e B). Un altro fosfo-epitopo riconosciuto dall'anticorpo AT8 (Ser202) non è invece modificato, indicando che la fosforilazione non è omogenea all'interno dei diversi pools di tau e che A β PP (ed il suo signalling) induce modificazioni specifiche (Fig. 1C). È importante notare che questo switch nucleo/citoscheletro di fosfo-tau è riscontrabile anche in fibroblasti con trisomia 21 (Figs 2C e 3B) comparati con fibroblasti non trisomici (Fig. 2A e 3A) o con altra trisomia (Fig. 2B), ed addirittura in cervelli autoptici di AD (Fig. 4B). Questi dati suggeriscono quindi che l'overespressione, anche limitata e transiente di A β PP, possa condurre all'attivazione di un segnale diretto alla modulazione di chinasi o fosfatasi che, in ultima analisi, potrebbero condurre all'iperfosforilazione di tau. Si rafforza quindi l'idea di una diretta correlazione tra ammontare di A β PP e rapporti relativi di fosforilazione tra il pool nucleare e quello citoscheletrico di tau, sia *in vitro* sia *ex-vivo*. I dati sui tessuti cerebrali AD (rispetto ai controlli non-dementi) impongono una ulteriore riflessione sul

ruolo di tau nella demenza di Alzheimer. L'attenzione su tau (e soprattutto sulla quota fosforilata di tau) si è sempre focalizzata sui NFTs, considerandoli giustamente come la più probabile causa della degenerazione assonale. Poco si sa invece sul ruolo della quota nucleare di tau, sulla sua funzione fisiologica nel nucleo e sugli interattori di tau in quella sede (Sjoberg et al., 2005; Rossi et al., 2008; Brady et al., 1995; Loomis et al., 1990). È stato giustamente ipotizzato un ruolo per tau nella stabilità della cromatina e nella regolazione della mitosi, ma tutto sommato sono ancora poche le informazioni sul pool nucleare di tau e sull'eventuale coinvolgimento nella patologia. I nostri dati indicano un fenotipo abbastanza chiaro, in cui nell'AD risulta praticamente assente il pool neuronale nucleare di tau e compare il ben noto fenotipo di aggregazione molto pronunciato negli assoni degenerati e nel neuropilo (Fig. 4B). Quale sia causa o conseguenza della malattia è ancora tutto da decifrare. Il fatto che *in vitro* noi possiamo in qualche modo mimare questo fenotipo, semplicemente aumentando i livelli di espressione di A β PP (o bloccandone il processamento γ -secretasico; Figs. 5 e 9), suggerisce che vi possa essere una qualche correlazione patogenetica tra livelli di A β PP e fosforilazione di tau, e che il rapporto tra i due pools nucleo/citoscheletro di tau debba avere una qualche importanza sulla stabilità cellulare. Occorre inoltre notare come almeno tre isoforme di tau (D, E ed F) se analizzate con software opportuno (ExPasy – NetNES; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) hanno al loro interno un potenziale segnale di esporto nucleare (NES), e che nostri esperimenti con un bloccante del trasporto nucleo-citoscheletro (vedi Fig. 6) dimostrano sia mediante western blotting sia in immunofluorescenza che, in teoria, potrebbe essere la stessa tau che cicla, in seguito a stimoli opportuni, tra il nucleo ed il citoscheletro. Ovviamente questi esperimenti non escludono che parallelamente siano le chinasi/fosfatasi coinvolte nella fosforilazione di tau a traslocare in seguito ad attivazione specifica. Altri gruppi di ricerca hanno, infatti, dimostrato che bloccando il trasporto nucleo-citoplasma con la leptomicina B si osserva un accumulo della fosfatasi PP2A a livello nucleare (Flegg et al., 2010). Per quanto riguarda ERK1/2 sappiamo, invece, che tale chinasi, mancando della sequenza NES non trasloca da sola secondo un meccanismo di esporto dipendente da CMR-1, ma aiutata dalla chinasi MEK (Adachi et al. 2000). Considerando che, bloccando il trasporto nucleo-citoplasma viene circoscritta la localizzazione nucleare delle fosfatasi responsabili della defosforilazione di tau (Liu et al., 2005; Wang et al., 2007) e sapendo che PP2A è in grado anche di inattivare la chinasi ERK1/2 (Junttila et al., 2008), risulta chiaro che lo spegnimento del segnale nucleare di fosfo-tau dopo il blocco della funzione

del traslocatore CMR-1 potrebbe essere dovuto anche ad una circoscrizione nucleare delle fosfatasi.

Per meglio chiarire la correlazione tra A β PP, suo processing, attivazione di chinasi e fosforilazione di tau, abbiamo utilizzato fibroblasti privi di A β PP (KO A β PP) o KO PS comparandoli con i fibroblasti wild type (MEF wt). Resta infatti da capire se la funzione della γ -secretasi sia legata ad una gain-of-function o piuttosto ad una loss-of-function nella genesi dell'AD, come suggerito da alcuni autori (Shen and Kelleher, III, 2007).

Infatti, in modelli animali in cui si determina un knock-out condizionale di PS1 nell'adulto si riscontra perdita neuronale e iperfosforilazione di Tau, pur in assenza di placche. Suggerendo quindi che per quanto riguarda strettamente il danno neuronale A β e placche potrebbero non essere fondamentalmente necessarie per produrre tale danno. Questa osservazione è anche in linea con risultati ottenuti in diversi modelli di topi transgenici esprimenti mutazioni multiple su A β PP e PS1 dove, pur in abbondanza di amiloide, raramente mostrano segni di perdita neuronale. In questo scenario una loss-of-function di PS1 e PS2 potrebbe essere invece responsabile di un fenotipo di morte neuronale legato ad infiammazione ed iperfosforilazione di Tau (Shen and Kelleher, III, 2007).

Comunque occorre ricordare che il modello sperimentale MEF KO PS, in cui l'attività γ -secretasica è assente per ablazione dei geni PS1 e PS2, appresenta una condizione in cui si ottiene un aumento endogeno di CTFs, e concomitantemente l'assenza di generazione di A β o AICD. Nelle cellule KO PS (che rappresentano quindi un possibile modello di loss of function di PS) osserviamo, rispetto alle cellule wild type o KO A β PP, già in condizioni basali:

- 1-un aumento della quota citoscheletale di tau e sua fosforilazione rapida (Figs, 5 e 7A);
- 2-un significativo aumento di fosfo-ERK1,2 e di fosfo-AKT1 (Fig.7A)

Questi dati ci suggeriscono quindi una triplice informazione:

- a) da una parte sembrano suggerire che il blocco del processing di A β PP (Fig. 9 con DAPT) sia correlabile con un signaling che, a sua volta, aumenta la fosforilazione di tau nel citoscheletro, diminuendola nel nucleo;
- b) che il signaling in questione riguarda, tra le potenziali chinasi coinvolgibili, essenzialmente ERK1,2 e non GSK3 β .
- c) che probabilmente la correlazione tra A β PP, signalling e fosforilazione di tau non dipende da A β .

Per quanto riguarda il primo aspetto non sappiamo se il legame tra A β PP e la delocalizzazione di tau sia dovuta più ad un accumulo di CTFs o se alla mancata traslocazione di AICD nel nucleo (entrambi associati alla “loss of function” di PS), tuttavia dati precedenti ed osservazioni non riportate in questa tesi ci fanno supporre che sia l’aumento dei CTFs a caratterizzare il fenotipo (Nizzari et al., 2012). Infatti la semplice overespressione di C99 o di C83 (pur in presenza di γ -secretasi attiva) è sufficiente ad indurre attivazione di ERK1,2 e la fosforilazione di tau. È importante notare da questo punto di vista che, mentre nella visione dell’ “ipotesi dell’amiloide” il frammento C83 essendo non-amiloidogenico è guardato come “positivo” e non coinvolto nella patogenesi dell’AD, nel nostro sistema il C83 si verrebbe invece a trovare assieme al C99 nel mantenimento di un signaling che, in ultima analisi, arriva a tau, e quindi anch’esso potrebbe partecipare ad un pathway patologico.

Per quanto riguarda invece il differente contributo di ERK1,2 e GSK3 β , lo si evince chiaramente considerando che ad una attivazione di AKT1 corrisponde in realtà una disattivazione di GSK3 β ; che quindi non potrebbe fosforilare i suoi substrati (leggasi tau) adeguatamente. Tuttavia è opportuno considerare almeno altri due aspetti non secondari:

1) GSK3 α/β inattivo (ossia fosforilato a livello della Serina 9 da AKT1) non è più in grado di indurre la degradazione di β -Catenina, che risulta pertanto essere stabilizzata ed essere libera di traslocare nel nucleo dove può svolgere la sua funzione di fattore trascrizionale stimolando la crescita e la proliferazione cellulare (Saifo et al., 2010)

2) AKT1 attivato è in grado di attivare mTOR che a sua volta inibisce il processo autofagico (Wu et al. 2009, Fan et al., 2010). L’alterato funzionamento della macchina autofagica, responsabile della clearance dei rifiuti cellulari, determinerebbe una mancata degradazione di tau e quindi un suo accumulo a livello intracellulare, evento che favorirebbe il meccanismo di formazione di aggregati intracellulari neurofibrillari.

Prendendo in considerazione quanto dimostrato da altri gruppi di ricerca è quindi ipotizzabile che l’attivazione di AKT1 mediata da A β PP, benché non direttamente coinvolta nella fosforilazione degli epitopi “mitotici” di tau, potrebbe da una parte contribuire comunque alla proliferazione cellulare via β -catenina (in parallelo alla via di ERK1,2) e dall’altro potrebbe invece essere correlata ad un’inibizione dell’autofagia e della degradazione di tau o di A β .

Per quanto riguarda ERK1,2 risulta evidente che il contributo del signaling A β PP-Grb2-ERK1,2-Tau (Nizzari et al., 2007; Nizzari et al., 2012) potrebbe essere direttamente correlabile con la proliferazione cellulare. Da questo punto di vista è estremamente rilevante il fatto che ERK1,2 e tau abbiano simile cinetica di attivazione anche dopo stimolo mitogenico (Figs. 7 e 8). A questo proposito occorre considerare che i fosfo-epitopi esaminati sono tutti associati a fosforilazioni patogenetiche riscontrate quindi nei NFTs dei pazienti AD; ma alcune di esse (Thr 212/Ser 214 e Thr181) sono state associate *in vitro* ad eventi mitotici (Vincent et al., 1998; Illenberger et al., 1998).

In letteratura è riportato ad esempio che gli epitopi riconosciuti da AT100 possono essere fosforilati da PKA e JNK2 o da PKA e SAPK4 -p38 Δ in sequenza (Yoshida and Goedert, 2006). Altri studi precedenti avevano indicato altre chinasi, quali GSK3 β e PKA (in presenza di eparina) oppure cdk5, ERK1,2, CaMKII responsabili della fosforilazione di Thr 212/Ser 214 in maniera più o meno coordinata. AT270 (Thr181) sembrerebbe un buon substrato per ERK1,2 e GSK3 β (Wang et al., 2007). I nostri dati suggeriscono che nel caso di una attivazione indotta dall'overespressione di A β PP, il reclutamento di ERK1,2 è necessario e sufficiente a determinare la fosforilazione nei fosfo-epitopi Ser 422 e Thr181 possibilmente anche in coordinazione con altre chinasi non ancora identificate (Figs. 7A e 7B).

Infine è particolarmente interessante constatare come, in dipendenza di A β PP e del suo (mancato) processing si possa osservare una cinetica così rapida nella fosforilazione di tau (Fig. 8), indicandone chiaramente un coinvolgimento nella proliferazione cellulare. Che il target sia la proliferazione cellulare ce lo dimostrano gli esperimenti di MTT e di BrdU in cui sono confrontate prima cellule wt ed overesprimenti A β PP (Fig. 10) e poi wt ed esperimenti tau nel distretto citoscheletale (Fig. 11C e D) in cellule prive di γ -secretasi attiva. L'aumento di A β PP (e dei frammenti CTFS - Nizzari et al., 2007; 2012) induce un aumento della proliferazione cellulare (Fig. 10) e, sorprendentemente, il medesimo fenotipo lo si osserva semplicemente alterando i rapporti tau nucleare/citoscheletro (Fig. 11C e D), suggerendo ancora una volta un chiaro legame tra i due eventi. La fosforilazione di tau durante la proliferazione riguarda quindi in particolar modo il pool citoscheletrico (ad es. il blot in Fig. 8 è effettuato senza particolari detergenti e quindi la quota nucleare non è rilevante) come si evince anche dalla Fig. 11D in cui tau-GFP è chiaramente fosforilata ed assolutamente non nucleare. Che tau fosse fosforilabile durante la mitosi era già noto (vedi anche Fig. 11A e B), ma che la fosforilazione avesse una cinetica parallela a

quella di ERK1,2 e che dipendesse dall'ammontare e dal processing di A β PP sembra particolarmente rilevante per quanto concerne l'AD, ma anche per il ruolo potenziale di PS/ γ -secretasi nella proliferazione oncologica. Infatti altri substrati di γ -secretasi (quali Notch ad esempio) sono importanti target terapeutici in diverse forme tumorali, ed inibitori specifici verso il taglio γ -secretasico di Notch sono in fase di sperimentazione clinica avanzata nella terapia dei tumori. Sarebbe interessante da questo punto di vista studiare il potenziale ruolo anche di A β PP nella genesi di alcuni tumori, come recentemente sostenuto da alcuni autori che hanno riscontrato aumentati livelli di A β PP sia a livello di mRNA sia a livello di proteina in tumori tiroidei ed in carcinomi coloretali (Venkataramani et al., 2010; Hansel et al., 2003; Krause et al., 2008). Ma tornando all'AD, la domanda che si pone è se l'induzione di eventi proliferativi in neuroni postmitotici possa indurre i neuroni a rientrare nel ciclo cellulare con conseguente morte neuronale per apoptosi. Alcuni autori (Yang et al., 2001) hanno dimostrato che un numero significativo di neuroni della zona piramidale dell'ippocampo e di neuroni nei nuclei basali in cervelli affetti da AD, hanno subito una completa o parziale replicazione del DNA, completando la fase S della mitosi. Altri hanno individuato neuroni isolatamente trisomici (con più A β PP) o con alterazioni cromosomiche simili pur non essendo i soggetti analizzati affetti da trisomia 21 somatica (Potter, 1991), altri hanno direttamente individuato segni di rientro nel ciclo cellulare in cervelli di pazienti con AD (McShea et al., 1999 a,b), mentre non si osserva nei cervelli di controllo o nelle zone non affette ad AD (Yang et al., 2001). Un'ulteriore conferma che il rientro nel ciclo cellulare dei neuroni possa essere una causa della neurodegenerazione nell'AD, è rappresentata da un'aberrante attivazione delle chinasi ciclina-dipendenti (cdks) che funzionano durante il ciclo cellulare, ma non nei neuroni post-mitotici (Vincent et al., 2003). In particolare, cdk5 contribuisce anche alla fosforilazione di Tau negli stessi siti in cui la tau risulta essere iperfosforilata nei PHF (Paudel et al., 1993). Alterazioni del ciclo cellulare risultano comunque essere eventi molto precoci nello sviluppo dell'AD (Yang et al., 2003). Per verificare questi aspetti nel nostro modello abbiamo indotto un aumento di A β PP in neuroni differenziati, studiato il fenotipo di tau a livello nucleare e misurata la mortalità. I nostri dati indicano che cellule differenziate con elevati livelli di A β PP hanno una ridotta fosforilazione di tau nel pool nucleare, ed una aumentata mortalità rispetto a cellule transfettate con il solo vettore vuoto o codificante per GFP (Fig. 12). Queste informazioni suggeriscono quindi che l'overespressione di A β PP possa anche nei neuroni alterare il rapporto tra pool nucleare e

citoscheletrico di tau e che questo fenotipo, a differenza di quanto osservato in cellule non differenziate e proliferanti, è correlato con una elevata mortalità.

Quindi complessivamente i nostri dati indicano che A β PP in maniera diretta (aumento dei livelli) o indiretta (mutazioni che causano una riduzione o blocco del processing di γ -secretasi) indurrebbe un signaling mitogenico (e forse parallelamente ad una disfunzione di sistemi di clearance autofagici) che in neuroni postmitotici porterebbe ad un disequilibrio tra i pool fosforilati di tau e a degenerazione. Come detto però è difficile correlare l'ipotesi della loss of function (ridotto processing di A β PP) con l'ammontare di A β riscontrabile anche in pazienti estremamente giovani. Una ipotesi alternativa da valutare sarebbe quella che in realtà A β PP (o meglio in frammenti CTFs) sia processata da parte di γ -secretasi in parallelo con un altro recettore e che si osservi, in caso di mutazioni, una gain of function su A β PP ed una loss of function sull'altro recettore. Mentre quindi da una parte si favorisce la formazione di A β , dall'altra si indurrebbe un segnale parallelo (ancora tutto da decifrare) indirizzato all'attivazione di chinasi coinvolte nella riattivazione del ciclo cellulare in neuroni. Un punto comunque convergente tra signalling (sia di A β PP sia di altri sistemi recettoriali) e tau è il fatto, abbastanza condiviso, che specifiche chinasi vengano attivate o specifiche fosfatasi disattivate e che, in ultimo, il normale turnover e degradazione di tau vengano alterati e forse bloccati. È quindi importante, dal punto di vista terapeutico, pensare ad un intervento che potenzi la de-fosforilazione di tau ed incrementi il suo turnover.

In questo solco abbiamo quindi iniziato una serie di esperimenti utilizzando un modello transgenico murino esprimente l'isoforma umana di tau 4R0N (383 aa) portatrice della mutazione P301S, in un background C57BL/6J. Questi topi hanno già a partire dal 3°, 4° mese di vita un aumento significativo della quota fosforilata di tau (Fig. 13) sia solubile sia insolubile ed una presenza significativa di NFTs in diversi fosfo-epitopi di tau. Abbiamo successivamente analizzato la modulazione della fosforilazione di tau da parte del sodio selenato (NaSel), in quanto possibile attivatore di fosfatasi (e quindi in grado, potenzialmente, di revertire direttamente la iper-fosforilazione di tau) e come potenziale attivatore dei pathways autofagici (considerando il ruolo della fosfatasi PP2A anche nell'attivazione dell'autofagia (Magnaudeix et al., 2012)). Il trattamento continuativo con NaSel ha ridotto significativamente la fosforilazione della quota insolubile di tau a livello di tutti i fosfo-epitopi analizzati (Fig. 14) ed, in parte anche della quota solubile (Fig. 16). In particolare il trattamento con NaSel ha portato ad una significativa riduzione del numero

di inclusioni extra-nucleari di tau (Figs. 15 A e B) sia per gli epitopi Ser422, sia per Thr 212 e Ser 214. Come detto uno dei meccanismi attraverso cui il NaSel può contribuire alla riduzione della fosforilazione di tau è certamente dovuto all'attivazione di PP2A, come mostrato in Fig. 17, la quale a sua volta potrebbe agire direttamente su tau, compensando la fosforilazione indotta dalle chinasi ERK1,2 e simili. Tuttavia abbiamo voluto anche investigare se NaSel e PP2A potessero avere una regolazione dell'attività autofagica, data la modulazione del processo autofagico da parte di PP2A riportata da altri autori (Magnaudeix et al., 2013).

L'attivazione dell'autofagia è stata investigata misurando la modificazione conformazionale di LC3 (proteina associata ai microtubuli 1) comunemente usato come marcatore della formazione degli autofagosomi (Kabeya et al., 2000; Mizushima et al., 2007). LC3 migra in una forma inattiva a 16 KDa, nota come LC3-I e una forma attiva a circa 14 KDa, derivante da modifiche post-traduzionali, nota come LC3-II. La presenza, nonché l'entità dell'isoforma II di LC3, è associata con l'attivazione del processo autofagico ed in particolare con la formazione degli autofagosomi. Analizzando i topi P301S trattati con veicolo (H₂O) o NaSel mediante SDS-PAGE si nota un aumento di LC3 II (e quindi degli autofagosomi) nei campioni trattati (Fig. 18A), che colocalizza con fosfo-tau (Fig. 19 A e B) negli epitopi riconosciuti da AT100 ed AT180. L'aumentata presenza di autofagosomi nelle fettine cerebrali dei topi trattati con il NaSel è indice di una potenziale attivazione del processo autofagico e di aumentata degradazione di fosfo-tau.

Complessivamente il NaSel sembra quindi avere attraverso l'induzione di PP2A un duplice potenziale di riduzione della quota fosforilata a livello citoscheletrico di tau: da una parte potrebbe direttamente contrastare la fosforilazione delle chinasi che insistono su tau (quali ERK1,2 ad esempio), e dall'altra potrebbe contrastare pathway pro-aggregativi da blocco dell'autofagia potenzialmente innescati da altre chinasi quali AKT1.

Proponiamo quindi un nuovo modello di patologia correlato allo sviluppo di AD, in cui si rafforza l'idea di una diretta correlazione tra ammontare di A β PP, suo processing ed induzione di un signaling in cui sono coinvolte chinasi importanti quali ERK1,2 ed AKT1. A valle di questi eventi si trova direttamente tau, non solo in quanto proteina fosforilabile ed aggregabile in condizioni patologiche, ma probabilmente anche quale importante mediatore fisiologico della progressione cellulare attraverso una fine regolazione dinamica dei suoi diversi pool intracellulari: in special modo a livello nucleare e citoscheletrico. In questo scenario sono i rapporti relativi di fosforilazione tra il pool nucleare e quello citoscheletrico di tau a determinare il fenotipo e la potenziale instabilità nucleare

necessaria per la mitosi (Rossi et al., 2008). Restano ovviamente da chiarire molteplici aspetti legati alla funzione nucleare di tau, in primis approfondire la nostra conoscenza su quali siano i suoi partners e interattori nel nucleo. Infine, nella nostra visione, i dati sull'utilizzo di Sodio Selenato per correggere l'iperfosforilazione di tau rappresentano un primo tentativo di approccio terapeutico "multipurpose" che potrà essere ulteriormente raffinato solo quando le nostre conoscenze sui pathways che vedono A β PP, PSs, Tau e (perché no) anche apolipoproteina E (quale maggiore fattore di rischio di AD) saranno ricondotte ad un unico quadro omogeneo.

Referenze bibliografiche

- Acquati,F., Accarino,M., Nucci,C., Fumagalli,P., Jovine,L., Ottolenghi,S., & Taramelli,R. (2000) The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Letters* **468**, 59-64.
- Adachi M, Fukuda M, Nishida E (2000) Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol* **148**: 849–856.
- Ahn,K., Shelton,C.C., Tian,Y., Zhang,X., Gilchrist,M.L., Sisodia,S.S., & Li,Y.M. (2010) Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**, 21435-21440.
- Alberici,A., Moratto,D., Benussi,L., Gasparini,L., Ghidoni,R., Gatta,L.B., Finazzi,D., Frisoni,G.B., Trabucchi,M., Growdon,J.H., Nitsch,R.M., & Binetti,G. (1999) Presenilin 1 protein directly interacts with Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 30764-30769.
- Allen,B., Ingram,E., Takao,M., Smith,M.J., Jakes,R., Virdee,K., Yoshida,H., Holzer,M., Craxton,M., Emson,P.C., Atzori,C., Migheli,A., Crowther,R.A., Ghetti,B., Spillantini,M.G., & Goedert,M. (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *Journal of Neuroscience* **22**, 9340-9351.
- Alzheimer, A. (1907) Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und phy- chish-Gerichtliche Medizin*. Berlin 64, 146-148.
- Amtul,Z., Lewis,P.A., Piper,S., Crook,R., Baker,M., Findlay,K., Singleton,A., Hogg,M., Younkin,L., Younkin,S.G., Hardy,J., Hutton,M., Boeve,B.F., Tang-Wai,D., & Golde,T.E. (2002) A presenilin 1 mutation associated with familial frontotemporal dementia inhibits gamma-secretase cleavage of ABPP and notch. *Neurobiology of Disease* **9**, 269-273.
- Annaert,W., Cupers,P., Saftig,P., & De,S.B. (2000) Presenilin function in ABPP processing. *Annals of the New York Academy of Sciences* **920**, 158-164.
- Annaert,W. & De,S.B. (2002) A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **18**, 25-51.
- Artavanis-Tsakonas,S., Rand,M.D., & Lake,R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.
- Avila,J., de Barreda,E.G., Pallas-Bazarra,N., & Hernandez,F. (2013) Tau and neuron aging. *Aging Dis.* **4**, 23-28.
- Baki,L., Shioi,J., Wen,P., Shao,Z., Schwarzman,A., Gama-Sosa,M., Neve,R., & Robakis,N.K. (2004) PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO Journal* **23**, 2586-2596.

- Ballatore,C., Lee,V.M., & Trojanowski,J.Q. (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat.Rev.Neurosci.* **8**, 663-672.
- Bellucci,A., Westwood,A.J., Ingram,E., Casamenti,F., Goedert,M., & Spillantini,M.G. (2004) Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. *American Journal of Pathology* **165**, 1643-1652.
- Benaroudj,N., Tarcsa,E., Cascio,P., & Goldberg,A.L. (2001) The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. *Biochimie* **83**, 311-318.
- Bentahir, M, Nyabi, O, Verhamme, J, Tolia, A, Horre, K, Wiltfang, J, Esselmann, H, De Strooper, B (2006) Presenilin clinical mutations can affect γ -secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* **96**, 732–742.
- Benton,D. (2002) Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning. *Nutr.Neurosci.* **5**, 363-374.
- Berger,Z., Roder,H., Hanna,A., Carlson,A., Rangachari,V., Yue,M., Wszolek,Z., Ashe,K., Knight,J., Dickson,D., Andorfer,C., Rosenberry,T.L., Lewis,J., Hutton,M., & Janus,C. (2007) Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *Journal of Neuroscience* **27**, 3650-3662.
- Bertram,L., Lange,C., Mullin,K., Parkinson,M., Hsiao,M., Hogan,M.F., Schjeide,B.M., Hooli,B., Divito,J., Ionita,I., Jiang,H., Laird,N., Moscarillo,T., Ohlsen,K.L., Elliott,K., Wang,X., Hu-Lince,D., Ryder,M., Murphy,A., Wagner,S.L., Blacker,D., Becker,K.D., & Tanzi,R.E. (2008) Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *American Journal of Human Genetics* **83**, 623-632.
- Bertram,L., Lill,C.M., & Tanzi,R.E. (2010) The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* **68**, 270-281.
- Binder, LI, Frankfurter, A, Rebhun, LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* **101**, 1371-1378
- Binder,L.I., Guillozet-Bongaarts,A.L., Garcia-Sierra,F., & Berry,R.W. (2005) Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1739**, 216-223.
- Blennow,K., de Leon,M.J., & Zetterberg,H. (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* **368**, 387-403.
- Boeras,D.I., Granic,A., Padmanabhan,J., Crespo,N.C., Rojiani,A.M., & Potter,H. (2008) Alzheimer's presenilin 1 causes chromosome missegregation and aneuploidy. *Neurobiology of Aging* **29**, 319-328.
- Bonda,D.J., Lee,H.P., Kudo,W., Zhu,X., Smith,M.A., & Lee,H.G. (2010) Pathological implications of cell cycle re-entry in Alzheimer disease. *Expert.Rev.Mol.Med.* **12**, e19.
- Borchelt,D.R., Thinakaran,G., Eckman,C.B., Lee,M.K., Davenport,F., Ratovitsky,T., Prada,C.M., Kim,G., Seekins,S., Yager,D., Slunt,H.H., Wang,R., Seeger,M., Levey,A.I., Gandy,S.E., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., Price,D.L., Younkin,S.G., & Sisodia,S.S. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**, 1005-1013.

- Borg,J.P., Ooi,J., Levy,E., & Margolis,B. (1996) The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol.Cell Biol.* **16**, 6229-6241.
- Boulianne,G.L., Livne-Bar,I., Humphreys,J.M., Liang,Y., Lin,C., Rogaev,E., & St George-Hyslop,P. (1997) Cloning and characterization of the Drosophila presenilin homologue. *Neuroreport* **8**, 1025-1029.
- Braak,H. & Braak,E. (1996) Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol.Scand.Suppl* **165**, 3-12.
- Braak,H. & Braak,E. (1997) Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of Aging* **18**, 351-357.
- Brady,R.M., Zinkowski,R.P., & Binder,L.I. (1995) Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiology of Aging* **16**, 479-486.
- Braithwaite,S.P., Stock,J.B., Lombroso,P.J., & Nairn,A.C. (2012) Protein phosphatases and Alzheimer's disease. *Prog.Mol.Biol.Transl.Sci.* **106**, 343-379.
- Brandt, R, Léger, J, LeeG (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *The Journal of Cell Biology.* **131**, 1327-1340
- Buee,L., Bussiere,T., Buee-Scherrer,V., Delacourte,A., & Hof,P.R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research.Brain Research Reviews* **33**, 95-130.
- Bugiani,O., Murrell,J.R., Giaccone,G., Hasegawa,M., Ghigo,G., Tabaton,M., Morbin,M., Primavera,A., Carella,F., Solaro,C., Grisoli,M., Savoiaro,M., Spillantini,M.G., Tagliavini,F., Goedert,M., & Ghetti,B. (1999) Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **58**, 667-677.
- Butner,K.A. & Kirschner,M.W. (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *Journal of Cell Biology* **115**, 717-730.
- Caccamo,A., Magri,A., Medina,D.X., Wisely,E.V., Lopez-Aranda,M.F., Silva,A.J., & Oddo,S. (2013) mTor regulates tau phosphorylation and degradation: implications for alzheimer's disease and other tauopathies. *Aging Cell*.
- Cacquevel, M, Aeschbach L, Houacine, J, Fraering, PC (2012) Alzheimer's Disease-Linked Mutations in Presenilin-1 Result in a Drastic Loss of Activity in Purified c-Secretase Complexes. *PLoS ONE* **7**, e35133
- Cameron,B. & Landreth,G.E. (2010) Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* **37**, 503-509.
- Canu,N., Dus,L., Barbato,C., Ciotti,M.T., Brancolini,C., Rinaldi,A.M., Novak,M., Cattaneo,A., Bradbury,A., & Calissano,P. (1998) Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *Journal of Neuroscience* **18**, 7061-7074.

- Cardoso,B.R., Ong,T.P., Jacob-Filho,W., Jaluul,O., Freitas,M.I., & Cozzolino,S.M. (2010) Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. *British Journal of Nutrition* **103**, 803-806.
- Cereda,E., Pedrolli,C., Zagami,A., Vanotti,A., Piffer,S., Faliva,M., Rondanelli,M., & Caccialanza,R. (2013) Alzheimer's disease and mortality in traditional long-term care facilities. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **56**, 437-441.
- Chambery,A., Colucci-D'Amato,L., Vissers,J.P., Scarpella,S., Langridge,J.I., & Parente,A. (2009) Proteomic profiling of proliferating and differentiated neural mes-c-myc A1 cell line from mouse embryonic mesencephalon by LC-MS. *J.Proteome.Res.* **8**, 227-238.
- Chang,K.H., Vincent,F., & Shah,K. (2012) Deregulated Cdk5 triggers aberrant activation of cell cycle kinases and phosphatases inducing neuronal death. *Journal of Cell Science* **125**, 5124-5137.
- Chavez-Gutierrez,L., Bammens,L., Benilova,I., Vandersteen,A., Benurwar,M., Borgers,M., Lismont,S., Zhou,L., Van,C.S., Esselmann,H., Wiltfang,J., Serneels,L., Karran,E., Gijzen,H., Schymkowitz,J., Rousseau,F., Broersen,K., & De,S.B. (2012) The mechanism of gamma-Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO Journal* **31**, 2261-2274.
- Citron,M., Westaway,D., Xia,W., Carlson,G., Diehl,T., Levesque,G., Johnson-Wood,K., Lee,M., Seubert,P., Davis,A., Kholodenko,D., Motter,R., Sherrington,R., Perry,B., Yao,H., Strome,R., Lieberburg,I., Rommens,J., Kim,S., Schenk,D., Fraser,P., St George,H.P., & Selkoe,D.J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Medicine* **3**, 67-72.
- Corcoran,N.M., Martin,D., Hutter-Paier,B., Windisch,M., Nguyen,T., Nheu,L., Sundstrom,L.E., Costello,A.J., & Hovens,C.M. (2010) Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J.Clin.Neurosci.* **17**, 1025-1033.
- Corder,E.H., Saunders,A.M., Risch,N.J., Strittmatter,W.J., Schmechel,D.E., Gaskell,P.C., Jr., Rimmler,J.B., Locke,P.A., Conneally,P.M., Schmechel,K.E., & . (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics* **7**, 180-184.
- Cross D, Tapia L, Garrido J, Maccioni RB. 1996. Tau-like proteins associated with centrosomes in cultured cells. *Exp Cell Res* **229**, 387–390
- Cupers,P., Orlans,I., Craessaerts,K., Annaert,W., & De,S.B. (2001) The amyloid precursor protein (ABPP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *Journal of Neurochemistry* **78**, 1168-1178.
- Daigle,I. & Li,C. (1993) apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 12045-12049.
- David,D.C., Layfield,R., Serpell,L., Narain,Y., Goedert,M., & Spillantini,M.G. (2002) Proteasomal degradation of tau protein. *Journal of Neurochemistry* **83**, 176-185.

- De,S.B. (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **38**, 9-12.
- De,S.B. (2007) Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* **8**, 141-146.
- De,S.B. & Annaert,W. (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *Journal of Cell Science* **113** (Pt 11), 1857-1870.
- De,S.B. & Annaert,W. (2010) Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **26**, 235-260.
- De Jonghe,C, Esselens,C, Kumar-Singh,S, Craessaerts,K, Serneels,S, Checler,F, Annaert,W, Van Broeckhoven,C, De Strooper,B. (2001) Pathogenic ABPP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and ABPP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet.* **16**,1665-71.
- DeKosky,S.T. & Scheff,S.W. (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology* **27**, 457-464.
- Delacourte,A. & Buee,L. (2000) Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. *Current Opinion in Neurology* **13**, 371-376.
- Delobel,P., Flament,S., Hamdane,M., Mailliot,C., Sambo,A.V., Begard,S., Sergeant,N., Delacourte,A., Vilain,J.P., & Buee,L. (2002) Abnormal Tau phosphorylation of the Alzheimer-type also occurs during mitosis. *Journal of Neurochemistry* **83**, 412-420.
- Delobel,P., Lavenir,I., Ghetti,B., Holzer,M., & Goedert,M. (2006) Cell-cycle markers in a transgenic mouse model of human tauopathy: increased levels of cyclin-dependent kinase inhibitors p21Cip1 and p27Kip1. *American Journal of Pathology* **168**, 878-887.
- Dermaut,B., Kumar-Singh,S., Engelborghs,S., Theuns,J., Rademakers,R., Saelens,J., Pickut,B.A., Peeters,K., van den Broeck,M., Vennekens,K., Claes,S., Cruts,M., Cras,P., Martin,J.J., Van,B.C., & De Deyn,P.P. (2004b) A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not beta-amyloid plaques. *Annals of Neurology* **55**, 617-626.
- Dickson,D.W. (1997) The pathogenesis of senile plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **56**, 321-339.
- Eikelenboom,P., Bate,C., Van Gool,W.A., Hoozemans,J.J., Rozemuller,J.M., Veerhuis,R., & Williams,A. (2002) Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia* **40**, 232-239.
- Ertekin-Taner,N. (2010b) Genetics of Alzheimer disease in the pre- and post-GWAS era. *Alzheimers.Res.Ther.* **2**, 3.
- Fan,Q.W., Cheng,C., Hackett,C., Feldman,M., Houseman,B.T., Nicolaides,T., Haas-Kogan,D., James,C.D., Oakes,S.A., Debnath,J., Shokat,K.M., & Weiss,W.A. (2010) Akt and autophagy cooperate to promote survival of drug-resistant glioma. *Sci.Signal.* **3**, ra81.

- Ferrer,I, Boada Rovira,M, Sánchez Guerra,ML, Rey,MJ, Costa-Jussá,F (2004) Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 14,11-20.
- Flegg, CP, Sharma, M, Medina-Palazon, C, Jamieson, C, Galea, M, Brocardo, MG, Mills, K, Henderson, BR. (2010) Nuclear export and centrosome targeting of the protein phosphatase 2A subunit B56alpha: role of B56alpha in nuclear export of the catalytic subunit. *J Biol Chem.* **285**;18144-54.
- Fuentealba,R.A., Barria,M.I., Lee,J., Cam,J., Araya,C., Escudero,C.A., Inestrosa,N.C., Bronfman,F.C., Bu,G., & Marzolo,M.P. (2007) ApoER2 expression increases Abeta production while decreasing Amyloid Precursor Protein (ABPP) endocytosis: Possible role in the partitioning of ABPP into lipid rafts and in the regulation of gamma-secretase activity. *Mol.Neurodegener.* **2**, 14.
- Gandy,S., Naslund,J., & Nordstedt,C. (2001) Alzheimer's disease. Molecular consequences of presenilin-1 mutation. *Nature* **411**, 654-656.
- Gandy,S. & Petanceska,S. (2000) Regulation of Alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1502**, 44-52.
- Gao,Y. and S.W.Pimplikar. (2001) The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 14979-14984.
- Geller,L.N. & Potter,H. (1999) Chromosome missegregation and trisomy 21 mosaicism in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* **6**, 167-179.
- Georgakopoulos,A., Marambaud,P., Efthimiopoulos,S., Shioi,J., Cui,W., Li,H.C., Schutte,M., Gordon,R., Holstein,G.R., Martinelli,G., Mehta,P., Friedrich,V.L., Jr., & Robakis,N.K. (1999) Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts. *Molecular Cell* **4**, 893-902.
- Glenner,G.G. & Wong,C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **120**, 885-890.
- Goedert,M., Ghetti,B., & Spillantini,M.G. (2012) Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease. *Cold Spring Harb.Perspect.Med.* **2**, a006254.
- Goedert,M., Jakes,R., Crowther,R.A., Cohen,P., Vanmechelen,E., Vandermeeren,M., & Cras,P. (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochemical Journal* **301** (Pt 3), 871-877.
- Goedert,M., Jakes,R., & Vanmechelen,E. (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neuroscience Letters* **189**, 167-169.
- Goedert,M. & Spillantini,M.G. (2000) Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1502**, 110-121.

- Goedert,M. & Spillantini,M.G. (2011) Pathogenesis of the tauopathies. *Journal of Molecular Neuroscience* **45**, 425-431.
- Goedert,M., Spillantini,M.G., Cairns,N.J., & Crowther,R.A. (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* **8**, 159-168.
- Goedert,M., Spillantini,M.G., Jakes,R., Rutherford,D., & Crowther,R.A. (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **3**, 519-526.
- Goedert,M., Wischik,C.M., Crowther,R.A., Walker,J.E., & Klug,A. (1988a) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 4051-4055.
- Golde,T.E. & Eckman,C.B. (2003) Physiologic and pathologic events mediated by intramembranous and juxtamembranous proteolysis. *Sci.STKE*. **2003**, RE4.
- Greenberg,S.G. & Davies,P. (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 5827-5831.
- Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K., Tung,Y.C., Quinlan,M., Wisniewski,H.M., & Binder,L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 4913-4917.
- Gu,H., Wei,X., Chen,S., Kurz,A., Muller,U., Gasser,T., Dodel,R.C., Farlow,M.R., & Du,Y. (2011) Association of clusterin gene polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease. *Dement.Geriatr.Cogn Disord.* **32**, 198-201.
- Guisse,S., Braguer,D., Carles,G., Delacourte,A., & Briand,C. (2001) Hyperphosphorylation of tau is mediated by ERK activation during anticancer drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience Research* **63**, 257-267.
- Haass,C., Hung,A.Y., Schlossmacher,M.G., Teplow,D.B., & Selkoe,D.J. (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 3021-3024.
- Halliday,G., Bigio,E.H., Cairns,N.J., Neumann,M., Mackenzie,I.R., & Mann,D.M. (2012) Mechanisms of disease in frontotemporal lobar degeneration: gain of function versus loss of function effects. *Acta Neuropathol.* **124**, 373-382.
- Hansel,D.E., Rahman,A., Wehner,S., Herzog,V., Yeo,C.J., & Maitra,A. (2003) Increased expression and processing of the Alzheimer amyloid precursor protein in pancreatic cancer may influence cellular proliferation. *Cancer Research* **63**, 7032-7037.
- Hardy,J. (2009b) The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reA β PP raisal. *Journal of Neurochemistry* **110**, 1129-1134.
- Hardy,J. & Selkoe,D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.

Harold,D., Abraham,R., Hollingworth,P., Sims,R., Gerrish,A., Hamshere,M.L., Pahwa,J.S., Moskvina,V., Dowzell,K., Williams,A., Jones,N., Thomas,C., Stretton,A., Morgan,A.R., Lovestone,S., Powell,J., Proitsi,P., Lupton,M.K., Brayne,C., Rubinsztein,D.C., Gill,M., Lawlor,B., Lynch,A., Morgan,K., Brown,K.S., Passmore,P.A., Craig,D., McGuinness,B., Todd,S., Holmes,C., Mann,D., Smith,A.D., Love,S., Kehoe,P.G., Hardy,J., Mead,S., Fox,N., Rossor,M., Collinge,J., Maier,W., Jessen,F., Schurmann,B., van den Bussche,H., Heuser,I., Kornhuber,J., Wiltfang,J., Dichgans,M., Frolich,L., Hampel,H., Hull,M., Rujescu,D., Goate,A.M., Kauwe,J.S., Cruchaga,C., Nowotny,P., Morris,J.C., Mayo,K., Sleegers,K., Bettens,K., Engelborghs,S., De Deyn,P.P., Van,B.C., Livingston,G., Bass,N.J., Gurling,H., McQuillin,A., Gwilliam,R., Deloukas,P., Al-Chalabi,A., Shaw,C.E., Tsolaki,M., Singleton,A.B., Guerreiro,R., Muhleisen,T.W., Nothen,M.M., Moebus,S., Jockel,K.H., Klopp,N., Wichmann,H.E., Carrasquillo,M.M., Pankratz,V.S., YOUNKIN,S.G., Holmans,P.A., O'Donovan,M., Owen,M.J., & Williams,J. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics* **41**, 1088-1093.

Heilig,E.A., Xia,W., Shen,J., & Kelleher,R.J., III (2010) A presenilin-1 mutation identified in familial Alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of gamma-secretase activity. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 22350-22359.

Himmler,A., Drechsel,D., Kirschner,M.W., & Martin,D.W., Jr. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol.Cell Biol.* **9**, 1381-1388.

Hirata-Fukae,C., Li,H.F., Ma,L., Hoe,H.S., Rebeck,G.W., Aisen,P.S., & Matsuoka,Y. (2009) Levels of soluble and insoluble tau reflect overall status of tau phosphorylation in vivo. *Neuroscience Letters* **450**, 51-55.

Hollingworth,P., Harold,D., Sims,R., Gerrish,A., Lambert,J.C., Carrasquillo,M.M., Abraham,R., Hamshere,M.L., Pahwa,J.S., Moskvina,V., Dowzell,K., Jones,N., Stretton,A., Thomas,C., Richards,A., Ivanov,D., Widdowson,C., Chapman,J., Lovestone,S., Powell,J., Proitsi,P., Lupton,M.K., Brayne,C., Rubinsztein,D.C., Gill,M., Lawlor,B., Lynch,A., Brown,K.S., Passmore,P.A., Craig,D., McGuinness,B., Todd,S., Holmes,C., Mann,D., Smith,A.D., Beaumont,H., Warden,D., Wilcock,G., Love,S., Kehoe,P.G., Hooper,N.M., Vardy,E.R., Hardy,J., Mead,S., Fox,N.C., Rossor,M., Collinge,J., Maier,W., Jessen,F., Ruther,E., Schurmann,B., Heun,R., Kolsch,H., van den Bussche,H., Heuser,I., Kornhuber,J., Wiltfang,J., Dichgans,M., Frolich,L., Hampel,H., Gallacher,J., Hull,M., Rujescu,D., Giegling,I., Goate,A.M., Kauwe,J.S., Cruchaga,C., Nowotny,P., Morris,J.C., Mayo,K., Sleegers,K., Bettens,K., Engelborghs,S., De Deyn,P.P., Van,B.C., Livingston,G., Bass,N.J., Gurling,H., McQuillin,A., Gwilliam,R., Deloukas,P., Al-Chalabi,A., Shaw,C.E., Tsolaki,M., Singleton,A.B., Guerreiro,R., Muhleisen,T.W., Nothen,M.M., Moebus,S., Jockel,K.H., Klopp,N., Wichmann,H.E., Pankratz,V.S., Sando,S.B., Aasly,J.O., Barcikowska,M., Wszolek,Z.K., Dickson,D.W., Graff-Radford,N.R., Petersen,R.C., van Duijn,C.M., Breteler,M.M., Ikram,M.A., DeStefano,A.L., Fitzpatrick,A.L., Lopez,O., Launer,L.J., Seshadri,S., Berr,C., Campion,D., Epelbaum,J., Dartigues,J.F., Tzourio,C., Alperovitch,A., Lathrop,M., Feulner,T.M., Friedrich,P., Riehle,C., Krawczak,M., Schreiber,S., Mayhaus,M., Nicolhaus,S., Wagenpfeil,S., Steinberg,S., Stefansson,H., Stefansson,K., Snaedal,J., Bjornsson,S., Jonsson,P.V., Chouraki,V., Genier-Boley,B., Hiltunen,M., Soininen,H., Combarros,O., Zelenika,D., Delepine,M., Bullido,M.J., Pasquier,F., Mateo,I., Frank-Garcia,A., Porcellini,E., Hanon,O., Coto,E., Alvarez,V., Bosco,P., Siciliano,G., Mancuso,M., Panza,F., Solfrizzi,V., Nacmias,B., Sorbi,S.,

- Bossu,P., Piccardi,P., Arosio,B., Annoni,G., Seripa,D., Pilotto,A., Scarpini,E., Galimberti,D., Brice,A., Hannequin,D., Licastro,F., Jones,L., Holmans,P.A., Jonsson,T., Riemenschneider,M., Morgan,K., Younkin,S.G., Owen,M.J., O'Donovan,M., Amouyel,P., & Williams,J. (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics* **43**, 429-435.
- Holmes,C., Boche,D., Wilkinson,D., Yadegarfar,G., Hopkins,V., Bayer,A., Jones,R.W., Bullock,R., Love,S., Neal,J.W., Zotova,E., & Nicoll,J.A. (2008) Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* **372**, 216-223.
- Holtzman,D.M., Herz,J., & Bu,G. (2012) Apolipoprotein e and apolipoprotein e receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb.Perspect.Med.* **2**, a006312.
- Howell, B.W., Hawkes, R., Soriano, P., and Cooper, J.A. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* **389**, 733–737.
- Hu,Q., Cool,B.H., Wang,B., Hearn,M.G., & Martin,G.M. (2002) A candidate molecular mechanism for the association of an intronic polymorphism of FE65 with resistance to very late onset dementia of the Alzheimer type. *Human Molecular Genetics* **11**, 465-475.
- Hua, Q. and He, R. Q. (2002). Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept. Lett.* **9**, 349-357.
- Hua, Q, and He, RQ. (2003) Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim Biophys Acta.* **1645**, 205-11.
- Illenberger,S., Zheng-Fischhofer,Q., Preuss,U., Stamer,K., Baumann,K., Trinczek,B., Biernat,J., Godemann,R., Mandelkow,E.M., & Mandelkow,E. (1998b) The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 1495-1512.
- Ingelson, M, Vanmechelen, E, Lannfelt, L. (1996) Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci Lett.* **220**, 9-12.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I. (2008) Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med.* **12**; 38-55;
- Iqbal, K, Liu, F, Gong, CX, Alonso, Adel C, Grundke-Iqbal, I. (2009) Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol.***118**; 53-69.
- Irizarry,M.C., McNamara,M., Fedorchak,K., Hsiao,K., & Hyman,B.T. (1997) ABPP Sw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **56**, 965-973.
- Ishrat,T., Parveen,K., Khan,M.M., Khuwaja,G., Khan,M.B., Yousuf,S., Ahmad,A., Shrivastav,P., & Islam,F. (2009) Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Brain Research* **1281**, 117-127.

- Johnson,G.L. & Lapadat,R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.
- Johnson,G.V. & Stoothoff,W.H. (2004) Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science* **117**, 5721-5729.
- Jucker,M. & Walker,L.C. (2011) Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of Neurology* **70**, 532-540.
- Junttila, MR, Li, SP, Westermarck, J. (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* **22**; 954-65.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720-5728.
- Kamal,A., Almenar-Queralt,A., LeBlanc,J.F., Roberts,E.A., & Goldstein,L.S. (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires ABPP . *Nature* **414**, 643-648.
- Kamal,A., Stokin,G.B., Yang,Z., Xia,C.H., & Goldstein,L.S. (2000) Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* **28**, 449-459.
- Kang,D.E., Yoon,I.S., Repetto,E., Busse,T., Yermian,N., Ie,L., & Koo,E.H. (2005) Presenilins mediate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and ERK activation via select signaling receptors. Selectivity of PS2 in platelet-derived growth factor signaling. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 31537-31547.
- Keeney,J.T., Swomley,A.M., Harris,J.L., Fiorini,A., Mitov,M.I., Perluigi,M., Sultana,R., & Butterfield,D.A. (2012) Cell cycle proteins in brain in mild cognitive impairment: insights into progression to Alzheimer disease. *Neurotox.Res.* **22**, 220-230.
- Kenessey,A., Nacharaju,P., Ko,L.W., & Yen,S.H. (1997) Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Journal of Neurochemistry* **69**, 2026-2038.
- Kim,M.Y., Park,J.H., Choi,E.J., & Park,H.S. (2005) Presenilin acts as a positive regulator of basal level activity of ERK through the Raf-MEK1 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **332**, 609-613.
- Korenberg,J.R., Pulst,S.M., Neve,R.L., & West,R. (1989) The Alzheimer amyloid precursor protein maps to human chromosome 21 bands q21.105-q21.05. *Genomics* **5**, 124-127.
- Kosik,K.S., Joachim,C.L., & Selkoe,D.J. (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 4044-4048.
- Kowalska,A. (2003) Amyloid precursor protein gene mutations responsible for early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* **41**, 35-40.

- Krause,K., Karger,S., Sheu,S.Y., Aigner,T., Kursawe,R., Gimm,O., Schmid,K.W., Dralle,H., & Fuhrer,D. (2008) Evidence for a role of the amyloid precursor protein in thyroid carcinogenesis. *Journal of Endocrinology* **198**, 291-299.
- Krylova, SM, Musheev, M, Nutiu, R, Li, Y, Lee, G, Krylov, SN. (2005) Tau protein binds single-stranded DNA sequence specifically – the proof obtained in vitro with non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. *FEBS Letters* **579** 1371–1375
- Kumar-Singh S, Theuns J, Van Broeck B, Pirici D, Vennekens K, Corsmit E, Cruts M, Dermaut B, Wang R, Van Broeckhoven C (2006) Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A β 42 and decreased A β 40. *Hum Mutat* **27**, 686–695.
- Lambourne,S.L., Sellers,L.A., Bush,T.G., Choudhury,S.K., Emson,P.C., Suh,Y.H., & Wilkinson,L.S. (2005) Increased tau phosphorylation on mitogen-activated protein kinase consensus sites and cognitive decline in transgenic models for Alzheimer's disease and FTDP-17: evidence for distinct molecular processes underlying tau abnormalities. *Mol.Cell Biol.* **25**, 278-293.
- Larson,E.B., Shadlen,M.F., Wang,L., McCormick,W.C., Bowen,J.D., Teri,L., & Kukull,W.A. (2004) Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Annals of Internal Medicine* **140**, 501-509.
- Lasagna-Reeves,C.A., Castillo-Carranza,D.L., Sengupta,U., Sarmiento,J., Troncoso,J., Jackson,G.R., & Kayed,R. (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB Journal* **26**, 1946-1959.
- Lautner,R., Mattsson,N., Scholl,M., Augutis,K., Blennow,K., Olsson,B., & Zetterberg,H. (2011) Biomarkers for microglial activation in Alzheimer's disease. *Int.J.Alzheimers.Dis.* **2011**, 939426.
- Lee,G., Cowan,N., & Kirschner,M. (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* **239**, 285-288.
- Lee,J.H., Yu,W.H., Kumar,A., Lee,S., Mohan,P.S., Peterhoff,C.M., Wolfe,D.M., Martinez-Vicente,M., Massey,A.C., Sovak,G., Uchiyama,Y., Westaway,D., Cuervo,A.M., & Nixon,R.A. (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* **141**, 1146-1158.
- Lee,V.M., Goedert,M., & Trojanowski,J.Q. (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annual Review of Neuroscience* **24**, 1121-1159.
- Li,J., Xu,M., Zhou,H., Ma,J., & Potter,H. (1997) Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. *Cell* **90**, 917-927.
- Liu,F., Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K., & Gong,C.X. (2005a) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *European Journal of Neuroscience* **22**, 1942-1950.

- Lleo,A., Waldron,E., von Arnim,C.A., Herl,L., Tangredi,M.M., Peltan,I.D., Strickland,D.K., Koo,E.H., Hyman,B.T., Pietrzik,C.U., & Berezovska,O. (2005a) Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (ABPP) for gamma-secretase. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 27303-27309.
- Loomis,P.A., Howard,T.H., Castleberry,R.P., & Binder,L.I. (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 8422-8426.
- Lopes,J.P., Oliveira,C.R., & Agostinho,P. (2009) Cell cycle re-entry in Alzheimer's disease: a major neuropathological characteristic? *Curr.Alzheimer Res.* **6**, 205-212.
- Love,S. (2004) Contribution of cerebral amyloid angiopathy to Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* **75**, 1-4.
- Lu Q, Wood JG. 1993. Characterization of fluorescently derivatized bovine tau protein and its localization and functions in cultured Chinese hamster ovary cells. *Cell Motil Cytoskel* **25**, 190–200.
- Maezawa,I., Hong,H.S., Liu,R., Wu,C.Y., Cheng,R.H., Kung,M.P., Kung,H.F., Lam,K.S., Oddo,S., Laferla,F.M., & Jin,L.W. (2008) Congo red and thioflavin-T analogs detect Abeta oligomers. *Journal of Neurochemistry* **104**, 457-468.
- Magnaudeix,A., Wilson,C.M., Page,G., Bauvy,C., Codogno,P., Leveque,P., Labrousse,F., Corre-Delage,M., Yardin,C., & Terro,F. (2013) PP2A blockade inhibits autophagy and causes intraneuronal accumulation of ubiquitinated proteins. *Neurobiology of Aging* **34**, 770-790.
- Marambaud,P., Shioi,J., Serban,G., Georgakopoulos,A., Sarner,S., Nagy,V., Baki,L., Wen,P., Efthimiopoulos,S., Shao,Z., Wisniewski,T., & Robakis,N.K. (2002) A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO Journal* **21**, 1948-1956.
- Marcinkiewicz,M. & Seidah,N.G. (2000) Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *Journal of Neurochemistry* **75**, 2133-2143.
- Mariani,E., Monastero,R., & Mecocci,P. (2007) Mild cognitive impairment: a systematic review. *J.Alzheimers.Dis.* **12**, 23-35.
- Martin, L, Latypova, X, Wilson, CM, Magnaudeix, A, Perrin, ML, Yardin, C, Terro, F. (2013) Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.***12**; 289-309.
- McShea,A., Wahl,A.F., & Smith,M.A. (1999a) Re-entry into the cell cycle: a mechanism for neurodegeneration in Alzheimer disease. *Medical Hypotheses* **52**, 525-527.
- McShea,A., Zelasko,D.A., Gerst,J.L., & Smith,M.A. (1999b) Signal transduction abnormalities in Alzheimer's disease: evidence of a pathogenic stimuli. *Brain Research* **815**, 237-242.

- Metuzals, J, Robitaille, Y., Houghton, S., Gauthier, S., Leblanc, R. Paired helical filaments and the cytoplasmic-nuclear interface in Alzheimer's disease. *J. Neurocytol.* **17**, 827-833; 1988.
- Minopoli,G., Stante,M., Napolitano,F., Telese,F., Aloia,L., De,F.M., Di,L.R., Pacelli,R., Brunetti,A., Zambrano,N., & Russo,T. (2007) Essential roles for Fe65, Alzheimer amyloid precursor-binding protein, in the cellular response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 831-835.
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function, *Genes Dev.* **21**, 2861-2873
- Modi,P.K., Komaravelli,N., Singh,N., & Sharma,P. (2012) Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 3722-3730.
- Moh,C., Kubiak,J.Z., Bajic,V.P., Zhu,X., Smith,M.A., & Lee,H.G. (2011) Cell cycle deregulation in the neurons of Alzheimer's disease. *Results and Problems in Cell Differentiation* **53**, 565-576.
- Monaco,E.A., III & Vallano,M.L. (2005) Role of protein kinases in neurodegenerative disease: cyclin-dependent kinases in Alzheimer's disease. *Front Biosci.* **10**, 143-159.
- Monastero,R., Mangialasche,F., Camarda,C., Ercolani,S., & Camarda,R. (2009) A systematic review of neuropsychiatric symptoms in mild cognitive impairment. *J.Alzheimers.Dis.* **18**, 11-30.
- Morishima-Kawashima M, Kosik KS. 1996. The pool of map kinase associated with microtubules is small but constitutively active. *Mol Biol Cell* **7**: 893–905.
- Morishima-Kawashima,M., Hasegawa,M., Takio,K., Suzuki,M., Titani,K., & Ihara,Y. (1993) Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* **10**, 1151-1160.
- Morishima-Kawashima, M, Hasegawa, M, Takio, K, Suzuki, M, Yoshida, H, Titani, K, Ihara, Y. (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem.* **270**, 823-9.
- Morris,H.R., Khan,M.N., Janssen,J.C., Brown,J.M., Perez-Tur,J., Baker,M., Ozansoy,M., Hardy,J., Hutton,M., Wood,N.W., Lees,A.J., Revesz,T., Lantos,P., & Rossor,M.N. (2001) The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Archives of Neurology* **58**, 1813-1816.
- Morris,M., Maeda,S., Vossel,K., & Mucke,L. (2011) The many faces of tau. *Neuron* **70**, 410-426.
- Muller,U.C. & Zheng,H. (2012a) Physiological functions of ABPP family proteins. *Cold Spring Harb.Perspect.Med.* **2**, a006288.
- Murakami,D., Okamoto,I., Nagano,O., Kawano,Y., Tomita,T., Iwatsubo,T., De,S.B., Yumoto,E., & Saya,H. (2003) Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene* **22**, 1511-1516.

- Murayama,O., Tomita,T., Nihonmatsu,N., Murayama,M., Sun,X., Honda,T., Iwatsubo,T., & Takashima,A. (1999) Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* **265**, 61-63.
- Nassif,M. & Hetz,C. (2012) Autophagy impairment: a crossroad between neurodegeneration and tauopathies. *BMC.Biol.* **10**, 78.
- Neely,K.M., Green,K.N., & Laferla,F.M. (2011) Presenilin is necessary for efficient proteolysis through the autophagy-lysosome system in a gamma-secretase-independent manner. *Journal of Neuroscience* **31**, 2781-2791.
- Neumann,M., Schulz-Schaeffer,W., Crowther,R.A., Smith,M.J., Spillantini,M.G., Goedert,M., & Kretschmar,H.A. (2001) Pick's disease associated with the novel Tau gene mutation K369I. *Annals of Neurology* **50**, 503-513.
- Neve,R.L., McPhie,D.L., & Chen,Y. (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1). *Brain Research* **886**, 54-66.
- Nizzari,M., Barbieri,F., Gentile,M.T., Passarella,D., Caorsi,C., Diaspro,A., Tagliatela,M., Pagano,A., Colucci-D'Amato,L., Florio,T., & Russo,C. (2012) Amyloid-beta protein precursor regulates phosphorylation and cellular compartmentalization of microtubule associated protein tau. *J.Alzheimers.Dis.* **29**, 211-227.
- Nizzari,M., Thellung,S., Corsaro,A., Villa,V., Pagano,A., Porcile,C., Russo,C., & Florio,T. (2012c) Neurodegeneration in Alzheimer disease: role of amyloid precursor protein and presenilin 1 intracellular signaling. *J.Toxicol.* **2012**, 187297.
- Nizzari,M., Venezia,V., Repetto,E., Caorsi,V., Magrassi,R., Gagliani,M.C., Carlo,P., Florio,T., Schettini,G., Tacchetti,C., Russo,T., Diaspro,A., & Russo,C. (2007) Amyloid precursor protein and Presenilin1 interact with the adaptor GRB2 and modulate ERK 1,2 signaling. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 13833-13844.
- Olafsson,I., Thorsteinsson,L., & Jensson,O. (1996) The molecular pathology of hereditary cystatin C amyloid angiopathy causing brain hemorrhage. *Brain Pathology* **6**, 121-126.
- Olesen,O.F. (1994) Proteolytic degradation of microtubule associated protein tau by thrombin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**, 716-721.
- Padurariu,M., Ciobica,A., Mavroudis,I., Fotiou,D., & Baloyannis,S. (2012) Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr.Danub.* **24**, 152-158.
- Papasozomenos, SC, Binder, LI. (1987) Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton.* **8**, 210-26
- Patrick,G.N., Zukerberg,L., Nikolic,M., de la Monte,S., Dikkes,P., & Tsai,L.H. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615-622.

- Paudel, H. K., Lew, J., Ali, Z., and Wang, J. H. (1993) Brain proline directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimers *J. Biol. Chem.* **268**, 23512–23518
- Pei,J.J., Braak,H., An,W.L., Winblad,B., Cowburn,R.F., Iqbal,K., & Grundke-Iqbal,I. (2002) Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Research.Molecular Brain Research* **109**, 45-55.
- Phiel,C.J., Wilson,C.A., Lee,V.M., & Klein,P.S. (2003) GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* **423**, 435-439.
- Pinney,J.H. & Hawkins,P.N. (2012) Amyloidosis. *Annals of Clinical Biochemistry* **49**, 229-241.
- Povova,J., Ambroz,P., Bar,M., Pavukova,V., Sery,O., Tomaskova,H., & Janout,V. (2012) Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: a review. *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.* **156**, 108-114.
- Potter H (1991) Review and hypothesis: Alzheimer disease and Down syndrome--chromosome 21 nondisjunction may underlie both disorders. *Am J Hum Genet.* **48**, 1192–1200.
- Preuss,U. & Mandelkow,E.M. (1998) Mitotic phosphorylation of tau protein in neuronal cell lines resembles phosphorylation in Alzheimer's disease. *European Journal of Cell Biology* **76**, 176-184.
- Raina,A.K., Zhu,X., & Smith,M.A. (2004) Alzheimer's disease and the cell cycle. *Acta Neurobiol.Exp.(Wars.)* **64**, 107-112.
- Raux,G., Gantier,R., Thomas-Anterion,C., Boulliat,J., Verpillat,P., Hannequin,D., Brice,A., Frebourg,T., & Campion,D. (2000) Dementia with prominent frontotemporal features associated with L113P presenilin 1 mutation. *Neurology* **55**, 1577-1578.
- Rayman,M.P. (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* **356**, 233-241.
- Reddy,P.H. (2009) Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *CNS.Spectr.* **14**, 8-13.
- Roncarati,R., Sestan,N., Scheinfeld,M.H., Berechid,B.E., Lopez,P.A., Meucci,O., McGlade,J.C., Rakic,P., & D'Adamio,L. (2002) The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 7102-7107.
- Rosen,D.R., Martin-Morris,L., Luo,L.Q., & White,K. (1989) A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 2478-2482.
- Rossi,G., Dalpra,L., Crosti,F., Lissoni,S., Sciacca,F.L., Catania,M., Di,F.G., Mangieri,M., Giaccone,G., Croci,D., & Tagliavini,F. (2008) A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability. *Cell Cycle* **7**, 1788-1794.

Rostagno,A. & Ghiso,J. (2009) Isolation and biochemical characterization of amyloid plaques and paired helical filaments. *Curr.Protoc.Cell Biol.* **Chapter 3**, Unit-33.

Rountree,S.D., Chan,W., Pavlik,V.N., Darby,E.J., & Doody,R.S. (2012) Factors that influence survival in a probable Alzheimer disease cohort. *Alzheimers.Res.Ther.* **4**, 16.

Rovelet-Lecrux,A., Hannequin,D., Raux,G., Le,M.N., Laquerriere,A., Vital,A., Dumanchin,C., Feuillet,S., Brice,A., Vercelletto,M., Dubas,F., Frebourg,T., & Campion,D. (2006) ABPP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genetics* **38**, 24-26.

Rozengurt, E. (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* **213**, 589–602.

Russo,C., Dolcini,V., Salis,S., Venezia,V., Zambrano,N., Russo,T., & Schettini,G. (2002) Signal transduction through tyrosine-phosphorylated C-terminal fragments of amyloid precursor protein via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 35282-35288.

Russo,C., Salis,S., Dolcini,V., Venezia,V., Song,X.H., Teller,J.K., & Schettini,G. (2001) Amino-terminal modification and tyrosine phosphorylation of [corrected] carboxy-terminal fragments of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Neurobiology of Disease* **8**, 173-180.

Russo,C., Schettini,G., Saido,T.C., Hulette,C., Lippa,C., Lannfelt,L., Ghetti,B., Gambetti,P., Tabaton,M., & Teller,J.K. (2000) Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature* **405**, 531-532.

Russo,C., Venezia,V., Repetto,E., Nizzari,M., Violani,E., Carlo,P., & Schettini,G. (2005) The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins: physiological and pathological implications. *Brain Research.Brain Research Reviews* **48**, 257-264.

Russo,C., Violani,E., Salis,S., Venezia,V., Dolcini,V., Damonte,G., Benatti,U., D'Arrigo,C., Patrone,E., Carlo,P., & Schettini,G. (2002c) Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AβN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *Journal of Neurochemistry* **82**, 1480-1489.

Saifo,M.S., Rempinski,D.R., Jr., Rustum,Y.M., & Azrak,R.G. (2010) Targeting the oncogenic protein beta-catenin to enhance chemotherapy outcome against solid human cancers. *Mol.Cancer* **9**, 310.

Salameh,A., Galvagni,F., Bardelli,M., Bussolino,F., & Oliviero,S. (2005) Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways. *Blood* **106**, 3423-3431.

Sastre,M., Klockgether,T., & Heneka,M.T. (2006) Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *International Journal of Developmental Neuroscience* **24**, 167-176.

- Saura,C.A., Choi,S.Y., Beglopoulos,V., Malkani,S., Zhang,D., Shankaranarayana Rao,B.S., Chattarji,S., Kelleher,R.J., III, Kandel,E.R., Duff,K., Kirkwood,A., & Shen,J. (2004) Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* **42**, 23-36.
- Scattoni,M.L., Gasparini,L., Alleva,E., Goedert,M., Calamandrei,G., & Spillantini,M.G. (2010) Early behavioural markers of disease in P301S tau transgenic mice. *Behavioural Brain Research* **208**, 250-257.
- Schaeffer,V., Lavenir,I., Ozcelik,S., Tolnay,M., Winkler,D.T., & Goedert,M. (2012) Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain* **135**, 2169-2177.
- Scheinfeld,M.H., Roncarati,R., Vito,P., Lopez,P.A., Abdallah,M., & D'Adamio,L. (2002) Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein 1 (JIP1) binds the cytoplasmic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (ABPP). *Journal of Biological Chemistry* **277**, 3767-3775.
- Schellenberg,G.D. & Montine,T.J. (2012) The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **124**, 305-323.
- Scheuner,D., Eckman,C., Jensen,M., Song,X., Citron,M., Suzuki,N., Bird,T.D., Hardy,J., Hutton,M., Kukull,W., Larson,E., Levy-Lahad,E., Viitanen,M., Peskind,E., Poorkaj,P., Schellenberg,G., Tanzi,R., Wasco,W., Lannfelt,L., Selkoe,D., & Younkin,S. (1996a) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and ABPP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine* **2**, 864-870.
- Selkoe,D.J. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology* **8**, 447-453.
- Selkoe,D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* **81**, 741-766.
- Selkoe, D. J., Ihara, Y.; Salazar, F. J. (1982) Alzheimer's disease: Insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. *Science* **215**, 1243-1245.
- Senechal,Y., Kelly,P.H., & Dev,K.K. (2008) Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. *Behavioural Brain Research* **186**, 126-132.
- Serrano-Pozo,A., Frosch,M.P., Masliah,E., & Hyman,B.T. (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb.Perspect.Med.* **1**, a006189.
- Seshadri,S., Fitzpatrick,A.L., Ikram,M.A., DeStefano,A.L., Gudnason,V., Boada,M., Bis,J.C., Smith,A.V., Carassquillo,M.M., Lambert,J.C., Harold,D., Schrijvers,E.M., Ramirez-Lorca,R., Debette,S., Longstreth,W.T., Jr., Janssens,A.C., Pankratz,V.S., Dartigues,J.F., Hollingworth,P., Aspelund,T., Hernandez,I., Beiser,A., Kuller,L.H., Koudstaal,P.J., Dickson,D.W., Tzourio,C., Abraham,R., Antunez,C., Du,Y., Rotter,J.I., Aulchenko,Y.S., Harris,T.B., Petersen,R.C., Berr,C., Owen,M.J., Lopez-Arrieta,J., Varadarajan,B.N., Becker,J.T., Rivadeneira,F., Nalls,M.A., Graff-Radford,N.R.,

Campion,D., Auerbach,S., Rice,K., Hofman,A., Jonsson,P.V., Schmidt,H., Lathrop,M., Mosley,T.H., Au,R., Psaty,B.M., Uitterlinden,A.G., Farrer,L.A., Lumley,T., Ruiz,A., Williams,J., Amouyel,P., Younkin,S.G., Wolf,P.A., Launer,L.J., Lopez,O.L., van Duijn,C.M., & Breteler,M.M. (2010) Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* **303**, 1832-1840.

Shahani,N. & Brandt,R. (2002) Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol.Life Sci.* **59**, 1668-1680.

Shankar,G.M. & Walsh,D.M. (2009) Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Abeta. *Mol.Neurodegener.* **4**, 48.

Shen,J. & Kelleher,R.J., III (2007) The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 403-409.

Shiarli,A.M., Jennings,R., Shi,J., Bailey,K., Davidson,Y., Tian,J., Bigio,E.H., Ghetti,B., Murrell,J.R., Delisle,M.B., Mirra,S., Crain,B., Zolo,P., Arima,K., Iseki,E., Murayama,S., Kretschmar,H., Neumann,M., Lippa,C., Halliday,G., Mackenzie,J., Khan,N., Ravid,R., Dickson,D., Wszolek,Z., Iwatsubo,T., Pickering-Brown,S.M., & Mann,D.M. (2006) Comparison of extent of tau pathology in patients with frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), frontotemporal lobar degeneration with Pick bodies and early onset Alzheimer's disease. *Neuropathology and AβPP lied Neurobiology* **32**, 374-387.

Shioi, J, Georgakopoulos, A, Mehta, P, Kouchi, Z, Litterst, CM, Baki, L, and Robakis NK. (2007) FAD mutants unable to increase neurotoxic Aβ 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on Aβ. *Journal of Neurochemistry*, 101, 674–681

Sjoberg,M.K., Shestakova,E., Mansuroglu,Z., Maccioni,R.B., & Bonnefoy,E. (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *Journal of Cell Science* **119**, 2025-2034.

Skaper,S.D. (2012) Alzheimer's disease and amyloid: culprit or coincidence? *International Review of Neurobiology* **102**, 277-316.

Smialowska, A, Baumeister, R. (2006) Presenilin function in *Caenorhabditis elegans*, *Neurodegener Dis.* **3**, 227-32.

Spillantini,M.G. & Goedert,M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences* **21**, 428-433.

Spillantini,M.G. & Goedert,M. (2000) Tau mutations in familial frontotemporal dementia. *Brain* **123** (Pt 5), 857-859.

Spillantini,M.G., Murrell,J.R., Goedert,M., Farlow,M.R., Klug,A., & Ghetti,B. (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 7737-7741.

- Spillantini, M.G., Van Swieten, J.C., & Goedert, M. (2000) Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Neurogenetics* **2**, 193-205.
- Stoothoff, W.H., Johnson, G.V. (2005) Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 280–297.
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégar, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., Colin, M., Bonnefoy, E., Buée, L., Galas, M.C. (2011) Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* **286**, 4566-75.
- Tanaka, T., Mayuyama, D., & Takeda, M. (2012) [Alzheimer disease and tau protein]. *Rinsho Shinkeigaku* **52**, 1171-1173.
- Tanzi, R.E. (2012) The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**.
- Tarr, P.E., Roncarati, R., Pelicci, G., Pelicci, P.G., & D'Adamio, L. (2002) Tyrosine phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic tail promotes interaction with Shc. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 16798-16804.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., & Katzman, R. (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology* **30**, 572-580.
- Theuns, J., Brouwers, N., Engelborghs, S., Sleegers, K., Bogaerts, V., Corsmit, E., De, P.T., van Duijn, C.M., De Deyn, P.P., & Van, B.C. (2006) Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *American Journal of Human Genetics* **78**, 936-946.
- Thinakaran, G. & Koo, E.H. (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 29615-29619.
- Thinakaran, G. & Parent, A.T. (2004) Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease. *Pharmacological Research* **50**, 411-418.
- Thompson, P.M. & Vinters, H.V. (2012) Pathologic lesions in neurodegenerative diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. Chromosoma* **107**, 1-40.
- Thurston, V.C., Zinkowski, R.P., Binder, L.I. (1996) Tau as a nucleolar protein in human non neural cells in vitro and in vivo. **105**, 20-30.
- van der Linde, R.M., Stephan, B.C., Savva, G.M., Denning, T., & Brayne, C. (2012) Systematic reviews on behavioural and psychological symptoms in the older or demented population. *Alzheimers. Res. Ther.* **4**, 28.
- van, E.J., Ke, Y.D., Liu, X., Delerue, F., Kril, J.J., Gotz, J., & Ittner, L.M. (2010) Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 13888-13893.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J.,

- Rogers,G., & Citron,M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-741.
- Vella,L.J. & CA β PP ai,R. (2012) Identification of a novel amyloid precursor protein processing pathway that generates secreted N-terminal fragments. *FASEB Journal* **26**, 2930-2940.
- Venezia,V., Nizzari,M., Carlo,P., Corsaro,A., Florio,T., & Russo,C. (2007) Amyloid precursor protein and presenilin involvement in cell signaling. *Neurodegener.Dis.* **4**, 101-111.
- Venezia,V., Russo,C., Repetto,E., Nizzari,M., Violani,E., Carlo,P., Marchetti,B., & Schettini,G. (2004) Apoptotic cell death and amyloid precursor protein signaling in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1030**, 339-347.
- Venkataramani,V., Rossner,C., Iffland,L., Schweyer,S., Tamboli,I.Y., Walter,J., Wirths,O., & Bayer,T.A. (2010) Histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits cancer cell proliferation via down-regulation of the alzheimer amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 10678-10689.
- Verdile,G., Gandy,S.E., & Martins,R.N. (2007) The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of Alzheimer's beta amyloid. *Neurochemical Research* **32**, 609-623.
- Vincent, I, Pae, CI, Hallows, JL. (2003) The cell cycle and human neurodegenerative disease. *Prog Cell Cycle Res.* **5**:31-41.
- Vincent,I., Zheng,J.H., Dickson,D.W., Kress,Y., & Davies,P. (1998) Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **19**, 287-296.
- Walsh,J.S., Welch,H.G., & Larson,E.B. (1990) Survival of outpatients with Alzheimer-type dementia. *Annals of Internal Medicine* **113**, 429-434.
- Wang, JZ, Grundke-Iqbal, I, Iqbal, K. (2007) Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci.* **25**, 59-68.
- Wang,Y., Kruger,U., Mandelkow,E., & Mandelkow,E.M. (2010) Generation of tau aggregates and clearance by autophagy in an inducible cell model of tauopathy. *Neurodegener.Dis.* **7**, 103-107.
- Wang,Y., Loomis,P.A., Zinkowski,R.P., & Binder,L.I. (1993) A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *Journal of Cell Biology* **121**, 257-267.
- Ward,S.M., Himmelstein,D.S., Lancia,J.K., & Binder,L.I. (2012) Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. *Biochemical Society Transactions* **40**, 667-671.
- Weingarten,M.D., Lockwood,A.H., Hwo,S.Y., & Kirschner,M.W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**, 1858-1862.

- Walker E. S., Martinez M., Brunkan A. L. and Goate A. (2005) Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios. *J. Neurochem.* **92**, 294–301.
- Wiley JC, Hudson M, Kanning KC, Schechterson LC, Bothwell M (2005) Familial Alzheimer's disease mutations inhibit γ -secretase-mediated liberation of β -amyloid precursor protein carboxy-terminal fragment. *J Neurochem* **94**, 1189–1201.
- Wolfe, M.S. (2007) When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* **8**, 136-140.
- Wolfe, M.S., De Los, A.J., Miller, D.D., Xia, W., & Selkoe, D.J. (1999) Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **38**, 11223-11230.
- Woods, J., Snape, M., & Smith, M.A. (2007) The cell cycle hypothesis of Alzheimer's disease: suggestions for drug development. *Biochimica et Biophysica Acta* **1772**, 503-508.
- Woods, N.K. & Padmanabhan, J. (2012) Neuronal calcium signaling and Alzheimer's disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **740**, 1193-1217.
- Wu, Y.T., Tan, H.L., Huang, Q., Ong, C.N., & Shen, H.M. (2009) Activation of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway promotes necrotic cell death via suppression of autophagy. *Autophagy*. **5**, 824-834.
- Xia, W., Ostaszewski, B.L., Kimberly, W.T., Rahmati, T., Moore, C.L., Wolfe, M.S., & Selkoe, D.J. (2000) FAD mutations in presenilin-1 or amyloid precursor protein decrease the efficacy of a gamma-secretase inhibitor: evidence for direct involvement of PS1 in the gamma-secretase cleavage complex. *Neurobiology of Disease* **7**, 673-681.
- Yamazaki, T., Zaal, K., Hailey, D., Presley, J., Lippincott-Schwartz, J., & Samelson, L.E. (2002) Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization. *Journal of Cell Science* **115**, 1791-1802.
- Yang, Y, Geldmacher, DS, Herrup, K. (2001) DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **21**; 2661-8.
- Yang, L.S. & Ksiezak-Reding, H. (1995) Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments. *European Journal of Biochemistry* **233**, 9-17.
- Yang, Y., Varvel, N.H., Lamb, B.T., & Herrup, K. (2006) Ectopic cell cycle events link human Alzheimer's disease and amyloid precursor protein transgenic mouse models. *Journal of Neuroscience* **26**, 775-784.
- Yim, S.Y., Chae, K.R., Shim, S.B., Hong, J.T., Park, J.Y., Lee, C.Y., Son, H.J., Sheen, Y.Y., & Hwang, D.Y. (2009) ERK activation induced by selenium treatment significantly downregulates beta/gamma-secretase activity and Tau phosphorylation in the transgenic rat overexpressing human selenoprotein M. *International Journal of Molecular Medicine* **24**, 91-96.

- Yoshida,H. & Goedert,M. (2006) Sequential phosphorylation of tau protein by cAMP-dependent protein kinase and SAPK4/p38delta or JNK2 in the presence of heparin generates the AT100 epitope. *Journal of Neurochemistry* **99**, 154-164.
- Zambrano,N., Bruni,P., Minopoli,G., Mosca,R., Molino,D., Russo,C., Schettini,G., Sudol,M., & Russo,T. (2001) The beta-amyloid precursor protein ABPP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutively active form of the Abl protooncogene. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 19787-19792.
- Zambrano,N., Buxbaum,J.D., Minopoli,G., Fiore,F., De,C.P., De,R.S., Faraonio,R., Sabo,S., Cheetham,J., Sudol,M., & Russo,T. (1997) Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 6399-6405.
- Zhang,C., Browne,A., Child,D., Divito,J.R., Stevenson,J.A., & Tanzi,R.E. (2010) Loss of function of ATXN1 increases amyloid beta-protein levels by potentiating beta-secretase processing of beta-amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 8515-8526.
- Zhang,Y.W., Thompson,R., Zhang,H., & Xu,H. (2011) ABPP processing in Alzheimer's disease. *Mol.Brain* **4**, 3.
- Zheng-Fischhofer,Q., Biernat,J., Mandelkow,E.M., Illenberger,S., Godemann,R., & Mandelkow,E. (1998) Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *European Journal of Biochemistry* **252**, 542-552.
- Zhu,X., Raina,A.K., Perry,G., & Smith,M.A. (2004) Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol.* **3**, 219-226.
- Zilkova,M., Koson,P., & Zilka,N. (2006) The hunt for dying neurons: insight into the neuronal loss in Alzheimer's disease. *Bratislavske Lekarske Listy* **107**, 366-373.
- Zuchner,S., Gilbert,J.R., Martin,E.R., Leon-Guerrero,C.R., Xu,P.T., Browning,C., Bronson,P.G., Whitehead,P., Schmechel,D.E., Haines,J.L., & Pericak-Vance,M.A. (2008) Linkage and association study of late-onset Alzheimer disease families linked to 9p21.3. *Annals of Human Genetics* **72**, 725-731.

PUBBLICAZIONI E PARTECIPAZIONI A CONGRESSI

Nizzari,M., Barbieri,F., Gentile,M.T., **Passarella,D.**, Caorsi,C., Diaspro,A., Taglialatela,M., Pagano,A., Colucci-D'Amato,L., Florio,T., & Russo,C.

“Amyloid-beta protein precursor regulates phosphorylation and cellular compartmentalization of microtubule associated protein tau.” *J.Alzheimers.Dis.* **29**, 211-227; (2012)

Passarella D., Cocco F., Nizzari M., Florio T., Russo C. “Fast phosphorylation of Microtubule associated protein tau during mitosis depends on APP processing.” *Journal of Alzheimers disease* (Submitted)

Passarella D., Cocco F., Nizzari M., Florio T., Di Zazzo E., Porcile C., Florio T., Russo C. “LRP8 receptor affects processing and signalling of amyloid precursor protein and modulates tau phosphorylation.” *J. Neuroscience* (Submitted)

Passarella D., Cocco F., Nizzari M., Florio T., Di Zazzo E., Porcile C., Florio T., Russo C. “LRP8 receptor interacts with Shc-Grb2 transducers and modulates downstream signalling events.” *JBiol Chem.* (Submitted).

C. Porcile, E. Di Zazzo, M. L. Monaco, G. D'Angelo, **D. Passarella**, C. Russo, A. Di Costanzo, A. Pattarozzi, M. Gatti, A. Bajetto, G. Oriani, A. Daniele e T. Florio (Campobasso, Napoli, Genova, Caserta)

“Adiponectin reduces cell proliferation in glioblastoma cells through a prolonged activation of mapk erk1/2” Poster presentato al 48° ccongresso dell'Associazione Italiana di Neuropatologia e Neurobiologia clinica Napoli, 24-25-26 maggio

Cocco F, **Passarella D**, Nizzari M., Barbieri F, Gentile MT, Caorsi V, Diaspro A, Taglialatela M, Pagano A, Colucci-D'Amato L, Florio T, Russo C

“AβPP (and its processing) regulate an intracellular signal pathway with a fast kinetic response and TAU phosphorylation” Poster presentato al 48° ccongresso dell'Associazione Italiana di Neuropatologia e Neurobiologia clinica Napoli, 24-25-26 maggio

Passarella D, Cocco F, Nizzari M., Barbieri F, Gentile MT, Caorsi V, Diaspro A, Taglialatela M, Pagano A, Colucci-D'Amato L, Florio T, Russo C

“AβPP and gamma secretase modulate Tau phosphorylation and cell cycle” Poster presentato al 48° ccongresso dell'Associazione Italiana di Neuropatologia e Neurobiologia clinica Napoli, 24-25-26 maggio

Ringraziamenti

Quanto il dottorato di ricerca mi abbia trasmesso ed insegnato è davvero qualcosa di inspiegabile. Alle spalle di questo mio percorso di ricerca, ma anche di vita, vi sono sicuramente persone che hanno alimentato e contribuito alla sua realizzazione e che meritano di essere ringraziate, perché da sola non sarebbe stato ciò che è stato.

La prima persona che merita il mio "Grazie" è il Professore Claudio Russo, colui che tra i suoi primi insegnamenti mi ha invogliato ad usare questa parola; perchè la parola "Grazie" spesso non si usa, dando per scontati tanti gesti ricevuti, ma non è così, e non si può descrivere quanto sia prezioso sentirsi dire "Grazie", così come lui ha sempre fatto con me, e come è bello dire "Grazie" quando veramente lo si sente, perchè si apprezza quello che si è ricevuto.

Un "Grazie" va a lui che per me è stata una guida scientifica sempre presente; colui che ogni giorno di questi tre anni ha alimentato la mia crescita, le mie idee, le mie fantasie scientifiche e la mia passione per questo lavoro, che è semplicemente il lavoro più bello che ci possa essere e di cui sono infinitamente innamorata. Ha sempre colmato i miei dubbi e le mie incertezze, disponibile ad aiutarmi e a venirmi incontro in qualsiasi momento qualora io ne ho avuto bisogno. Mi ha seguita, indirizzata, acculturata ma, allo stesso tempo, lasciata libera di esprimere e seguire le mie idee scientifiche: se alla fine di questi tre anni mi ritrovo un bel bagaglio dietro è perchè lui mi ha aiutato a riempirlo e non smetterò, per questo, mai di essergli grata.

Un "Grazie" va ad una persona che, oltre alla sua cultura scientifica, mi ha trasmesso anche la sua profonda umanità e che è stato per me una guida anche morale; la mia Stima nei suoi confronti è immensa e non smetterò mai di ringraziarlo per avermi guidata in questo meraviglioso percorso di dottorato.

Un ringraziamento va al Professore M. Tagliatela, per il quale nutro una profondissima stima. Un grazie va a lui per avermi aiutata ad essere attiva in questo mio percorso di dottorato e per avermi costantemente dato la possibilità di ottenere quanto ho raggiunto.

Un "Grazie" anche al Professore G.M. Grasso per avermi dato la possibilità di ottenere questo importante titolo, e all'UNIMOL, mia fedelissima università che, sebbene piccola e giovane, mi ha fatto crescere professionalmente, prima con la laurea e poi con il dottorato di ricerca, permettendomi di raggiungere quello che sono diventata ora.

Un sentito ringraziamento va al Professore M. Goedert e all'MRC per avermi dato la preziosissima possibilità di terminare il mio ultimo anno di dottorato in un eccellente e innovativo centro di ricerca. Un "Grazie" va al Prof. Goedert per aver creduto nelle mie potenzialità, per avermi dato fiducia e per aver captato in me quel qualcosa di importante per poter proseguire in questo meraviglioso, ma anche tanto difficile, mondo della ricerca.

“Grazie” al Professore Raimo, mio tutor delle tesi di laurea, nonché guida del mio percoroso universitario, che ha continuato, ad ogni modo, ad essere sempre presente e disponibile per me anche dopo la laurea, mai negandomi un aiuto ogni qual volta io ne ho avuto bisogno.

Un ringraziamento va alle mie amiche di laboratorio, con le quali sono cresciuta insieme professionalmente e che sono state per me sempre un importante punto di riferimento scientifico per ogni dubbio ed incertezza, ma anche la mia valvola di sfogo....le spettatrici attive di ogni nuova puntata della mia soap dottorale.

Un “Grazie” di cuore va alla piccola Fede, amica e collega in senso stretto perché con lei ho potuto fantasticare sui perché e sui come, la bella e impossibile tau, tanto conosciuta, ma anche tanto incompresa, possa essere fosforilata. Un “Grazie” va a lei per la sua preziosa collaborazione in lab, per aver condiviso con me idee scientifiche ed esperimenti, ma anche i piacevoli dissetanti “coca-cola moments” ed i riscaldanti “The breaks”. Il mio augurio è che, nonostante mi allontanerò fisicamente per un pò dal lab, saremo accomunate sempre dalla nostra passione per tau e che non smetteremo mai di sognare insieme su quel qualcosa di misterioso che si cela dietro questa piccola proteina.

Un “Grazie” va a Carola, un importante e costante punto di riferimento per me; il mio scudo, colei che sempre mi ha protetta dandomi quel pizzico di sicurezza e determinazione in più nei momenti di debolezza; colei che con la sua stima nei miei confronti mi ha sempre incoraggiata. Un “Grazie” va a lei perché non ha mai smesso di credere in me!

Nadia: abbiamo iniziato insieme il nostro percorso di dottorato davanti vassoi di pesche e dolcetti; poco sapevamo l’una dell’altra, in comune davanti a noi un bel percorso scientifico da intraprendere. Non abbiamo collaborato molto tra noi, non per nostra scelta ma semplicemente per filoni di ricerca diversi: lei DNA ed io Proteine. Nonostante questo, con lei c’è sempre stata quella consapevolezza che c’eravamo l’una l’altra ed una profonda e reciproca stima; un “Grazie” va a lei perché c’è sempre e comunque stata.

Un “Grazie” va ad Erika, la persona dai mille e preziosi consigli; la genialità, colei che ha avuto sempre una risposta pronta ai miei dubbi scientifici e tecnici. Nutro davvero una grande stima scientifica nei suoi confronti e la ringrazio per la sua generosità nel condividere con me la sua preparazione ogni qual volta ne abbia avuto bisogno.

Un “Grazie” a tutti gli altri del Laboratorio SpeS, in particolare a Giampaolo, che ha sempre rappresentato la preziosissima e calda nota positiva del lab; a Daniela, la mia sorella “Lenti”, con la quale ho condiviso un progetto di ricerca complesso, a volte da noi incompreso, ma una finestra indimenticabile di questo mio percorso che ci ha unite tanto e ci ha fatto tanto sorridere insieme; a Federica “grande”, che mi ha sempre regalato il suo sorriso e la sua disponibilità.

...scontato dire che oltre a considerarvi colleghi e accompagnatori di questo mio splendido percorso professionale siete stati e continuerete ad essere delle persone

semplicemente speciali per me per i quali nutro una profondissima stima, professionale e personale.

Ai miei colleghi dell'LMB, Graham, Isabelle, Jennifer e Ben, che mi hanno sempre supportata ed aiutata nelle nuove, diverse e controverse dinamiche dell'LMB e non mi hanno mai negato un aiuto e la loro disponibilità in lab.

Un "Grazie" va a Giorgia e Maria, per ultime solo perché non colleghe, ma Preziosamente Tanto Amiche; coloro che dall'esterno mi hanno sempre sostenuto in questo mio percorso e che hanno sempre creduto in me. Un "Grazie" di cuore va a loro per aver assecondato sempre le mie lunghe routine di laboratorio e i miei lunghi silenzi mentre ero assorta con le mie celluline, i miei topini o i miei adorati moscerini; Un "Grazie" di cuore a Giorgia per avermi preziosamente supportata nel mio ultimo tour de force di questo percorso; ad entrambe perché ci sono state in questi 3 anni di dottorato, ma ci sono state prima e so che continueranno sempre ad esserci per me.

Ai miei genitori, che hanno sempre creduto in me, per i quali sono stata e sono il loro orgoglio. Un infinito "Grazie" alle persone più importanti della mia vita; coloro che ci sono stati più di ogni altra persona, da lontano...in silenzio... semplicemente SEMPRE. "Grazie" di cuore, mamma e papà, ... vi Voglio Bene!

A mia sorella e mio cognato che mi hanno regalato l'orgoglio della mia vita...Dalila, Lorenzo e Francesco!...e, ovviamente, alle piccole pulci che con un solo semplice gesto fanno arrivare la Zia alle stelle, contribuendo così, con la loro semplice meravigliosa spontaneità, a rendermi la Zia più pazza e felice del mondo.

Ai miei nuovi amici di Cambridge...che, nonostante fossi per loro una sconosciuta venuta dal nulla, mi hanno subito voluta bene e sempre tanto stimata per i miei studi. A loro che hanno sempre fatto un tifo super matto per me...Grazie mille!

Alle mie nonne, i miei cugini e i miei zii...un "Grazie" per esserci sempre...ovunque io sia!

Spero di non aver dimenticato nessuno, ma qualora fosse successo, sarò felicissima di ringraziarlo di persona perchè il solo fatto che abbia letto queste mie righe significa che a lui non sono uno sconosciuta!